

DISSERTATION

Vergleichende Untersuchungen DNA-protektiver Effekte ausgewählter Antioxidantien (Grüntee-Extrakt, Gallussäure und Vitamin C) in inneren Organen und Blutzellen von Labornagern

angestrebter akademischer Grad

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Verfasserin/Verfasser: Nina Kager

Matrikel-Nummer: 0103734

Dissertationsgebiet

(lt. Studienblatt): Ernährungswissenschaften (A 091 474)

Betreuerin/Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Siegfried Knasmüller

Danksagung

Ich möchte im Folgenden einigen Leuten meinen Dank aussprechen, die mich im Laufe der letzten Jahre und bei der Durchführung und Erstellung meiner Dissertationsarbeit unterstützt haben:

Ao. Univ.-Prof. Dr. Siegfried Knasmüller, der mich in seine Arbeitsgruppe am Krebsforschungsinstitut aufgenommen, mir somit die Erarbeitung meiner Dissertation erst ermöglicht hat und mir als Betreuer zur Seite stand.

Ao. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner, für die Hilfe bei den Messungen der biochemischen und immunologischen Parameter und für die gute Zusammenarbeit.

Ao. Univ.-Prof. Dr. Michael Kundi, der mir bei der statistischen Auswertung mit hilfreichen Tipps zur Seite gestanden ist.

Ass. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ruth Quint, in deren Abteilung (Sektion Strahlenbiologie) ich die Bestrahlung der Labornager durchführen konnte.

Franziska Ferk, die mich in der praktischen Arbeit und den Umgang mit den Tieren eingeschult hat und mich bei der Durchführung der Experimente mit vollem Einsatz unterstützt hat möchte ich besonders danken!

Meinen Arbeitskolleginnen und Kollegen, Beate Moser, Christine Hölzl, Veronika Ehrlich, Miroslav Misik und Armen Nersesyan, für die Hilfe bei diversen Fragestellungen und die vielen unterhaltsamen gemeinsam verbrachten Stunden.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und vor allem auch bei meinem Freund Markus bedanken, die mir oft mit großer Geduld zur Seite standen und immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten!

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	I
Verzeichnis der Tabellen	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Literaturüberblick	2
2.1. Ursachen und Entstehung von oxidativem Stress	2
2.2. Reaktive Sauerstoffspezies und Krankheitsentstehung	5
2.2.1. Krebserkrankungen	6
2.2.2. Kardiovaskuläre Erkrankungen	7
2.2.3. Neurodegenerative Erkrankungen	9
2.2.4. Beeinflussung von Alterungsprozessen und des Immunsystems	10
2.2.5. Weitere Auswirkungen von oxidativem Stress	13
2.3. Schutzsubstanzen in der menschlichen Nahrung	13
2.3.1. Grüntee	14
2.3.1.1. Zusammensetzung von Grüntee	14
2.3.1.2. Auswirkung von Grüntee auf die menschliche Gesundheit	16
2.3.1.3. Schutz vor oxidativen DNA-Schäden durch Grüntee	16
2.3.2. Gallussäure	19
2.3.3. Vitamin C	20
2.4 Verfahren zur Identifikation von antioxidativ wirksamen Schutzsubstanzen in der menschlichen Nahrung	25
2.5. Einzelzellgelelektrophoresetests (SCGE-Test)	26
2.5.1. Entwicklung	26
2.5.2. Endpunkte von Einzelzellgelelektrophoresetests	27
2.5.3. Einsatz bei humanen Interventionsstudien	29
2.6. Biochemische Parameter	29

2.6.1. Gesamte antioxidative Kapazität (TEAC)	29
2.6.2. LDL-Oxidation.....	30
2.7. Immunologische Parameter	31
2.7.1. Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)	31
2.7.2. Interferon γ (IFN- γ).....	32
2.7.3. Interleukine 4, Interleukin 6 und Interleukin 10	33
2.8. Ionisierende Strahlung.....	34
3. Material und Methoden.....	36
3.1. Verwendete Chemikalien	36
3.2. Lösungen.....	37
3.3. Durchführung der Studie	38
3.3.1. Versuchstiere	38
3.3.2. Behandlung der Versuchstiere.....	39
3.3.2.1. Experimente mit unbestrahlten Tieren	40
3.3.2.2. Experimente mit bestrahlten Tieren.....	41
3.4. Isolierung der Lymphozyten, Gewinnung des Plasmas	42
3.5. Isolierung der Hepatozyten und Colonozyten	43
3.6. Durchführung der Einzelzellgelelektrophoresetests	43
3.6.1. Herstellung der Objektträger und Lyse.....	45
3.6.2. SCGE-Test unter Standard-Bedingungen	45
3.6.3. SCGE-Test mit läsionsspezifischen Enzymen	45
3.6.5. Auswertung und Statistik.....	46
3.7. Messung der biochemischen Parameter	47
3.7.1. Gesamte antioxidative Kapazität (TEAC)	47
3.7.1.2. Verwendete Lösungen	47
3.7.1.3. Durchführung der Messungen.....	48
3.7.2. LDL-Oxidation.....	49
3.7.3. Statistische Auswertung.....	49

3.8. Messung der immunologischen Parameter	49
3.8.1. Tumor Nekrose Faktor α	49
3.8.2. Interferon γ	50
3.8.3. Interleukin 4, Interleukin 6 und Interleukin 10	50
3.8.4. Statistische Auswertung.....	50
4. Ergebnisse.....	51
4.1 Experimente mit unbestrahlten Tieren	51
4.1.1 Einzelzellgelelektrophoresetests	51
4.1.1.1 Grüntee-Extrakt	51
4.1.1.2. Gallussäure.....	54
4.1.1.3. Vitamin C.....	55
4.1.1.4. Kombination von Grüntee-Extrakt, Gallussäure und Vitamin C	57
4.1.1.5. Effekte binärer Mischungen.....	58
4.1.2. Messung der biochemischen Parameter	60
4.1.2.1. Gesamte antioxidative Kapazität (TEAC)	60
4.1.2.2. LDL-Oxidation.....	61
4.1.3. Immunologische Parameter.....	62
4.1.3.1. Tumor Nekrose Faktor α	62
4.1.3.2. Interferon γ	63
4.1.3.3. Interleukin 4	63
4.1.3.4. Interleukin 10.....	64
4.2. Experimente mit bestrahlten Tieren	65
4.2.1. Kalibrationsexperimente.....	65
4.2.2 Ergebnisse der SCGE-Tests mit bestrahlten Tieren.....	66
4.2.3. Messung biochemischer Parameter mit bestrahlten Tieren	69
4.2.3.1. Gesamte antioxidative Kapazität (TEAC)	69
4.2.3.2. LDL-Oxidation.....	69
4.2.4. Immunologische Parameter.....	70

4.2.4.1. Tumor Nekrose Faktor α	70
4.2.4.2. Interferon γ	70
4.2.4.3. Interleukin 4, Interleukin 6 und Interleukin 10.....	71
5. Diskussion und Schlussfolgerungen.....	72
5.1. Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophoresetests	73
5.1.1. Basiswerte in unbestrahlten und γ -bestrahlten Tieren	73
5.1.2. Auswirkungen von Grüntee-Extrakt auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten	74
5.1.3. Auswirkungen von Gallussäure auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten	75
5.1.4. Auswirkungen von Ascorbinsäure auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten	77
5.1.5. Auswirkungen verschiedener Kombinationen der Antioxidantien auf die DNA- Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten	78
5.2. Ergebnisse der Messungen der biochemischen Parameter	79
5.2.1. Ergebnisse der TEAC-Messungen im Plasma	80
5.2.2. Ergebnisse der Messungen der LDL-Oxidation im Plasma.....	82
5.3. Ergebnisse der Messungen der immunologischen Parameter.....	83
5.4. Schlussfolgerungen.....	87
6. Zusammenfassung	90
7. Summary.....	92
8. Literaturverzeichnis	94

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Entstehung, Entgiftung und Folgen von oxidativem Stress	4
Abb. 2:	Verschiedene reaktive Sauerstoffspezies und Auswirkungen auf organische Moleküle	5
Abb. 3:	Direkte und indirekte Auslösung von DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies	6
Abb. 4:	Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen	8
Abb. 5:	Auswirkungen der LDL-Oxidation auf die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen	9
Abb. 6:	Überblick über oxidative und inflammatorische Prozesse und Zusammenhänge mit Alterungsprozessen	12
Abb. 7:	Struktur der im Grüntee vorkommenden Catechine	15
Abb. 8:	Strukturformel der Gallussäure	19
Abb. 9:	Strukturformel der Ascorbinsäure	20
Abb. 10:	Redox-Reaktion von Vitamin C	21
Abb. 11:	Anwendungsbereiche des Einzelzellgelelektrophoresetests	27
Abb. 12:	Definition und Berechnung der Tail-Intensität	28
Abb. 13:	Reaktion eines Antioxidans mit dem ABTS ⁺ Radikalkation	30
Abb. 14:	Signalpfade des Tumor Nekrose Faktor Rezeptor-1	32
Abb. 15:	Schematischer Überblick über gezielte und ungezielte Reaktionen auf ionisierende Strahlung	35
Abb. 16:	Schematische Darstellung der Durchführung der Studie	39
Abb. 17:	Versuchsablauf der Experimente mit bestrahlten Tieren	41
Abb. 18:	Him-OFA Ratte in Aluminiumgefäß kurz vor der Bestrahlung	41
Abb. 19:	Gewinnung der Lymphozyten durch Zentrifugation	42
Abb. 20:	Durchführung der Einzelzellgelelektrophoresetests	44
Abb. 21:	Auswertung eines Kometen mit Comet Assay IV	46
Abb. 22 a-i:	Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt (1,3 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten von Ratten	52

Abb. 23 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt (6,7 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten von Ratten	53
Abb. 24 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Gallussäure (0,2 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten von Ratten	54
Abb. 25 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Vitamin C (1,3 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten von Ratten	55
Abb. 26 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Vitamin C (6,7 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten von Ratten	56
Abb. 27 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung einer Kombination (1,3 mg GTE, 0,2mg GA und 6,7mg VC/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten von Ratten	57
Abb. 28 a-f: Auswirkungen oraler Verabreichung einer Kombination von Gallussäure (0,2 mg/kg KG) und Vitamin C (6,7mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten und Hepatozyten von Ratten	58
Abb. 29 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung einer Kombination von Gallussäure (0,2mg/kg KG) und Grüntee-Extrakt (1,3mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten von Ratten	59
Abb. 30 a-d: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt, Gallussäure, Vitamin C und einer Kombination der drei Antioxidantien auf die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma von Ratten	60
Abb. 31 a-d: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt, Gallussäure, Vitamin C und einer Kombination der drei Antioxidantien auf die LDL-Oxidation im Plasma von Ratten	61
Abb. 32 a-d: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt, Gallussäure, Vitamin C und einer Kombination der drei Antioxidantien auf die TNF- α -Konzentrationen im Plasma von Ratten	62
Abb. 33 a-c: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt, Gallussäure, Vitamin C und einer Kombination der drei Antioxidantien auf die IFN- γ -Konzentrationen im Plasma von Ratten	63
Abb. 34 a-d: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt, Gallussäure, Vitamin C und einer Kombination der drei Antioxidantien auf die IL-4-Konzentrationen im Plasma von Ratten	64
Abb. 35 a-c: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt, Vitamin C und einer Kombination der drei Antioxidantien auf die IL-10-Konzentrationen im Plasma von Ratten	65

Abb. 36 a-c: Oxidative DNA-Schäden in Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten von Ratten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Gamma-Dosen (7.7, 15.3, 22.0 und 30.0 Gy) in einer ⁶⁰ Co-Quelle	66
Abb. 37 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Gallussäure (0,2 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten bestrahlter Ratten	67
Abb. 38 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung eines Gemisches von drei Antioxidantien (1,3mg GTE, 0,2mg GA, 6,7mg VC/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten bestrahlter Ratten	68
Abb. 39: Auswirkungen von Gallussäure und einer Kombination von Antioxidantien auf die gesamte antioxidative Kapazität (TEAC) im Plasma bestrahlter Ratten	69
Abb. 40: Auswirkungen von Gallussäure und einer Kombination von Antioxidantien auf die LDL-Oxidation im Plasma bestrahlter Ratten	69
Abb. 41: Auswirkungen von Gallussäure und einer Kombination von Antioxidantien auf die TNF- α Konzentrationen im Plasma bestrahlter Ratten	70
Abb. 42: Auswirkungen von Gallussäure und einer Kombination von Antioxidantien auf die IFN- γ Konzentrationen im Plasma bestrahlter Ratten	71
Abb. 43 a-c: Auswirkungen von Gallussäure und einer Kombination von Antioxidantien auf die IL-4, IL-6 und IL-10 Konzentrationen im Plasma bestrahlter Ratten	71

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1:	Verhinderung oxidativer DNA-Schäden durch Grüntee in Humanstudien	17
Tabelle 2:	Verhinderung oxidativer DNA-Schäden durch Grüntee in Tierstudien	18
Tabelle 3:	Auswirkungen von Gallussäure auf oxidative DNA-Schäden	20
Tabelle 4:	Untersuchung antioxidativer Eigenschaften von Vitamin C in Humanstudien	23
Tabelle 5:	Untersuchung antioxidativer Eigenschaften von Vitamin C in Tierstudien	25
Tabelle 6:	Herkunft, CAS-Nummer und Verwendung der Chemikalien	36
Tabelle 7:	Dosierung der Antioxidantien, die im ersten Teil der Studie getestet wurden	40
Tabelle 8:	Änderung der gesamten antioxidativen Kapazität (TAC) durch Verabreichung von Grüntee und Vitamin C in Humanstudien	80
Tabelle 9:	Effekte Verabreichung von Grüntee und Vitamin C auf die LDL-Oxidation in Humanstudien	82
Tabelle 10:	Effekte der Verabreichung von Grüntee-Extrakt und Vitamin C auf immunologische Parameter (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 und IL-10)	84

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2`-Azinobis-3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure
ECG	Epicatechin-3-gallat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin-3-gallat
Endo III	Endonuklease III
FPG	Formamidopyrimidine-DNA-Glykosylase
GA	Gallussäure
GT	Grünte
GTE	Grünte-Extrakt
GTP	Grünte-Polyphenole
Gy	Gray
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukine
LDL	Lipoproteine niedriger Dichte
8-Oxo-dG	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SCGE	Einzelzellgelelektrophorese
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
VC	Vitamin C
W	Wasser

1. Einleitung und Fragestellung

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) kausal mit der Auslösung verschiedener Krankheiten in Zusammenhang stehen [1]. Typische Beispiele sind Krebs, Infertilität, altersbezogene Erkrankungen, neurodegenerative Störungen und kardiovaskuläre Erkrankungen [2-7]. Bereits seit den 1950er-Jahren suchen Wissenschaftler nach Schutzsubstanzen in der menschlichen Nahrung, und es war möglich, neben antioxidativ wirkenden Vitaminen eine Vielzahl von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zu identifizieren, die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) inaktivieren.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden drei vielversprechende Antioxidantien, nämlich Grüntee-Extrakt (Sunphenon), Gallussäure und Vitamin C (Ascorbinsäure) vergleichend in Tierexperimenten untersucht. Grüntee-Extrakt und Vitamin C werden als Nahrungsergänzungsmittel verwendet und auch zur Herstellung von funktionellen Lebensmitteln eingesetzt [8-10]. Die starken antioxidativen Eigenschaften der Gallussäure beim Menschen wurden erst vor kurzem am Institut für Krebsforschung entdeckt [11].

Die antioxidative Wirksamkeit von Grüntee-Extrakt, Vitamin C und Gallussäure wurde in inneren Organen (Leber, Dickdarm) sowie in Lymphozyten von Ratten mit Einzelzellgelelektrophoresetests (SCGE-Tests, Comet Assay) gemessen. Dieses Verfahren wird zunehmend eingesetzt, um Nahrungsinhaltsstoffe mit DNA-protektiven Eigenschaften zu detektieren, und beruht auf der Messung der DNA-Wanderung in einem elektrischen Feld [12,13]. Durch Einsatz von läsionsspezifischen Enzymen ist es möglich, die endogene Bindung von oxidierten Pyrimidinen und Purinen zu quantifizieren. Darüber hinaus wurden die DNA-protektiven Eigenschaften der untersuchten Antioxidantien nach exogener Schädigung durch ionisierende Bestrahlung (die Radikalbildung verursacht) untersucht.

Neben der Messung der DNA-Schädigung, die von besonderer Bedeutung ist, da sie eine Schlüsselrolle bei der Auslösung der erwähnten Krankheiten spielt, wurden weitere Parameter oxidativer Schäden erfasst, nämlich die gesamte antioxidative Kapazität (TEAC) und die Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL-Oxidation), ein Indikator für ein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Zusätzlich wurde eine Reihe immunologischer Parameter gemessen (Interleukin 4, 6 und 10, Tumor Nekrose Faktor α , Interferon-

y), da oxidativer Stress auch in Verbindung mit einer Abnahme von Immunfunktionen und der Entstehung von Entzündungen gebracht wird [1,14].

Im Wesentlichen sollen durch die vorliegende Arbeit folgende Fragen geklärt werden:
a) Welche der drei Nahrungsfaktoren (Grüntee-Extrakt, Gallussäure, Vitamin C) weist das höchste Schutzpotential gegenüber oxidativen Schäden der DNA auf?, b) sind in den inneren Organen wie Dickdarm und Leber Schutzeffekte nachweisbar?, c) ist es möglich, durch eine Kombination der Substanzen deren Wirksamkeit zu erhöhen? und d) weisen die Substanzen Wirksamkeit auf, wenn durch ROS-Belastung der Tiere oxidativer Stress ausgelöst wird?

2. Literaturüberblick

In diesem Kapitel wird auf die Ursachen und die Entstehung von oxidativem Stress und auf die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelösten Erkrankungen wie Krebs, kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen, Beeinflussung von Alterungsprozessen und Reaktionen des Immunsystems näher eingegangen. In einem weiteren Abschnitt werden die untersuchten Schutzsubstanzen in der menschlichen Nahrung (Grüntee-Extrakt, Gallussäure und Vitamin C) und deren Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit beschrieben. Den Abschluss des Literaturüberblicks bilden Kapitel, die die angewandten Methoden erklären. In diesem Abschnitt werden die Grundlagen des Einzelzellgelelektrophoretetests, der Messung der biochemischen (gesamte antioxidative Kapazität, Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte) und der immunologischen Parameter (Bestimmung von Tumor Nekrose Faktor α , Interferon γ und Interleukine) beschrieben.

2.1. Ursachen und Entstehung von oxidativem Stress

Untersuchungen der biologischen Effekte von Oxidantien zählen zu den größten Forschungsgebieten der Biomedizin, täglich werden mehr als zehn Artikel zu diesem Thema veröffentlicht [15]. Wie bereits Blomhoff et al. feststellen, ist der Begriff „oxidativer Stress“ nicht genau definiert, in einem Artikel zu diesem Thema geben sie folgende Beschreibung:

„Oxidativer Stress ist ein Zustand, der sich durch eine Ansammlung von nicht-enzymatischen Schäden an Molekülen auszeichnet, die die normale Funktion der Zelle oder des gesamten Organismus bedroht.“

Am Anfang der Reaktionskette, die zur Entstehung von oxidativem Stress führt, stehen Reduktions-Oxidations- („Redox-“) Reaktionen, die durch den Transfer von Elektronen oder Wasserstoffatomen zwischen mehreren Reaktionspartnern gekennzeichnet sind. Eine besondere Rolle kommt dem Sauerstoffmolekül zu, das Elektronen von anderen Molekülen durch nicht-enzymatische Autooxidation an sich zieht. Das Auseinanderbrechen von Elektronenpaaren führt zur Bildung von Prooxidantien, die in Radikale und Nichtradikale eingeteilt werden können. Freie Radikale, z.B. Superoxidradikal ($O_2^{\cdot -}$) und Hydroxylradikal (OH^{\cdot}), führen zu Lipid-Peroxidation, DNA-Strangbrüchen und Oxidation einer Vielzahl organischer Moleküle und besitzen ungepaarte Elektronen [16]. Zu den pro-oxidativen Nichtradikalen zählen u.a. H_2O_2 (Wasserstoffperoxid), organische Peroxide, Aldehyde und O_3 (Ozon).

ROS entstehen auch im Verlauf normaler zellulärer metabolischer Reaktionen [16]. Zu den endogenen Ursachen ihrer Entstehung zählen die mitochondriale oxidative Phosphorylierung, der P450 Metabolismus, die Freisetzung aus Peroxisomen und die Aktivierung von Entzündungsmediatoren [17]. Darüber hinaus können ROS Belastungen auch durch exogene Quellen verursacht werden, beispielsweise ionisierende Bestrahlung, die ROS-Freisetzung durch Spaltung des intrazellulären Wasser auslöst [18], Luftverschmutzung durch Tabakrauch und Abgase [19,20], Pestizide und Herbizide [21] sowie von der Industrie freigesetzte Chemikalien [22] (siehe Abbildung 1).

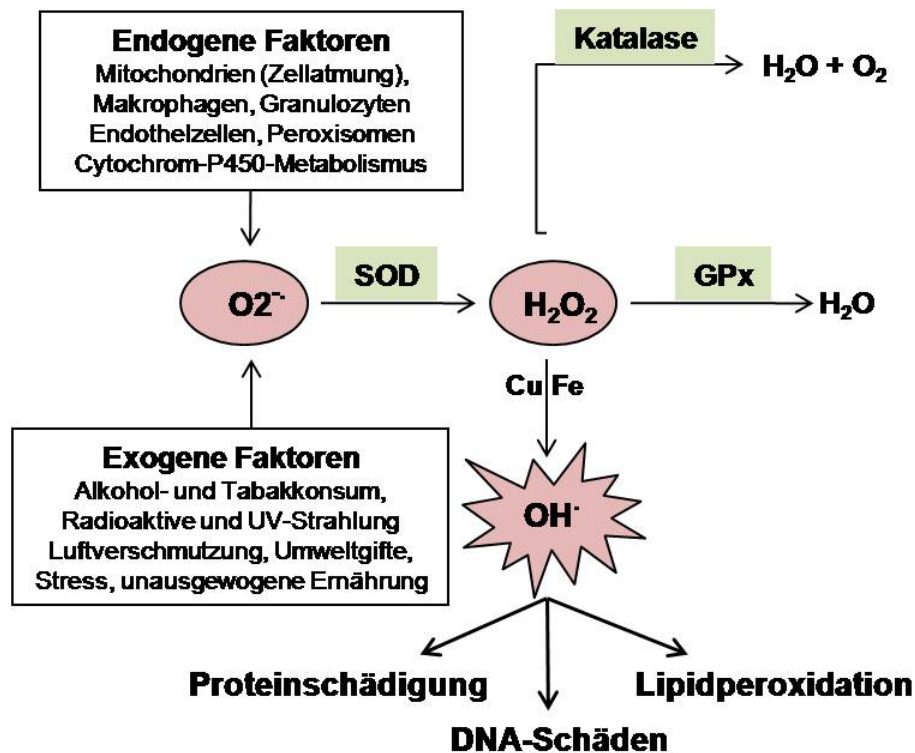


Abbildung 1: Entstehung, Entgiftung und Folgen von oxidativem Stress (modifiziert nach Ekert et al., 2006 [23]). Endogene und exogene Faktoren führen zur Bildung von Superoxidradikalen, die durch das antioxidativ wirksame Enzym Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Katalase bildet aus H_2O_2 Wasser und Sauerstoff, die Glutathionperoxidase spaltet H_2O aus H_2O_2 ab. In Gegenwart von Kupfer und Eisen kann es zur Bildung des Hydroxylradikals kommen, das Proteinschädigung, DNA-Schäden und Lipidperoxidation auslösen kann.

Im Organismus wird der Auslösung zellulärer Schäden durch ROS durch Abwehr-Mechanismen entgegengewirkt, oxidativer Stress kann daher auch als Ungleichgewicht der Entstehung von ROS und deren Inaktivierung definiert werden [24]. Erfolgt keine Inaktivierung durch Antioxidantien oder antioxidativ wirksame Enzyme (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase), kann oxidative Belastung Veränderungen zahlreicher zellulärer Bestandteile wie Zellmembranen, Lipoproteinen, Kohlenhydraten, RNA und DNA verursachen [15,16] (siehe Abbildung 2). In den folgenden Kapiteln wird auf die Auswirkungen und Interaktionen von ROS im menschlichen Organismus näher eingegangen.

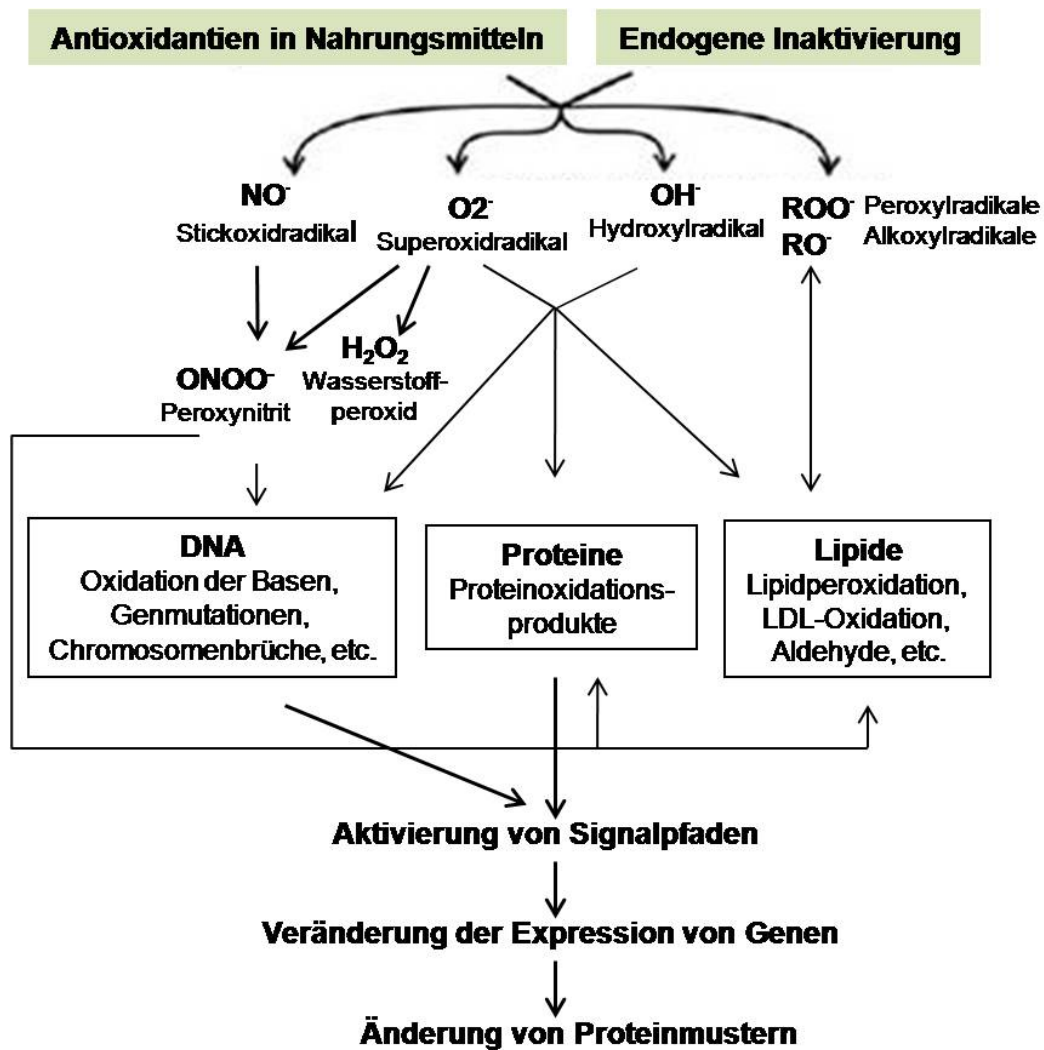


Abbildung 2: Verschiedene reaktive Sauerstoffspezies und Auswirkungen auf organische Moleküle (modifiziert nach Knasmüller et al., 2008 [1]).

2.2. Reaktive Sauerstoffspezies und Krankheitsentstehung

Schäden, die durch oxidativen Stress im Organismus hervorgerufen werden, zählen zu den Hauptursachen der Auslösung von Alterungsprozessen und von degenerativen Erkrankungen wie Krebs, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen und der Verschlechterung der Funktion des Immunsystems [2,5].

2.2.1. Krebserkrankungen

Im Mehrstufenkonzept (Initiation, Promotion und Progression) der chemischen Kanzerogenese spielen sowohl Mutationen als auch ein Anstieg der Zellproliferation durch ROS eine Rolle [25].

Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass freie Sauerstoffradikale an der Auslösung von Krebserkrankungen kausal beteiligt sind. DNA-Schäden werden entweder direkt (durch Oxidation von DNA-Basen) oder indirekt durch Lipidperoxydationsprozesse ausgelöst, die die Freisetzung DNA-schädigender Stoffwechselprodukte verursachen (siehe Abbildung 3).

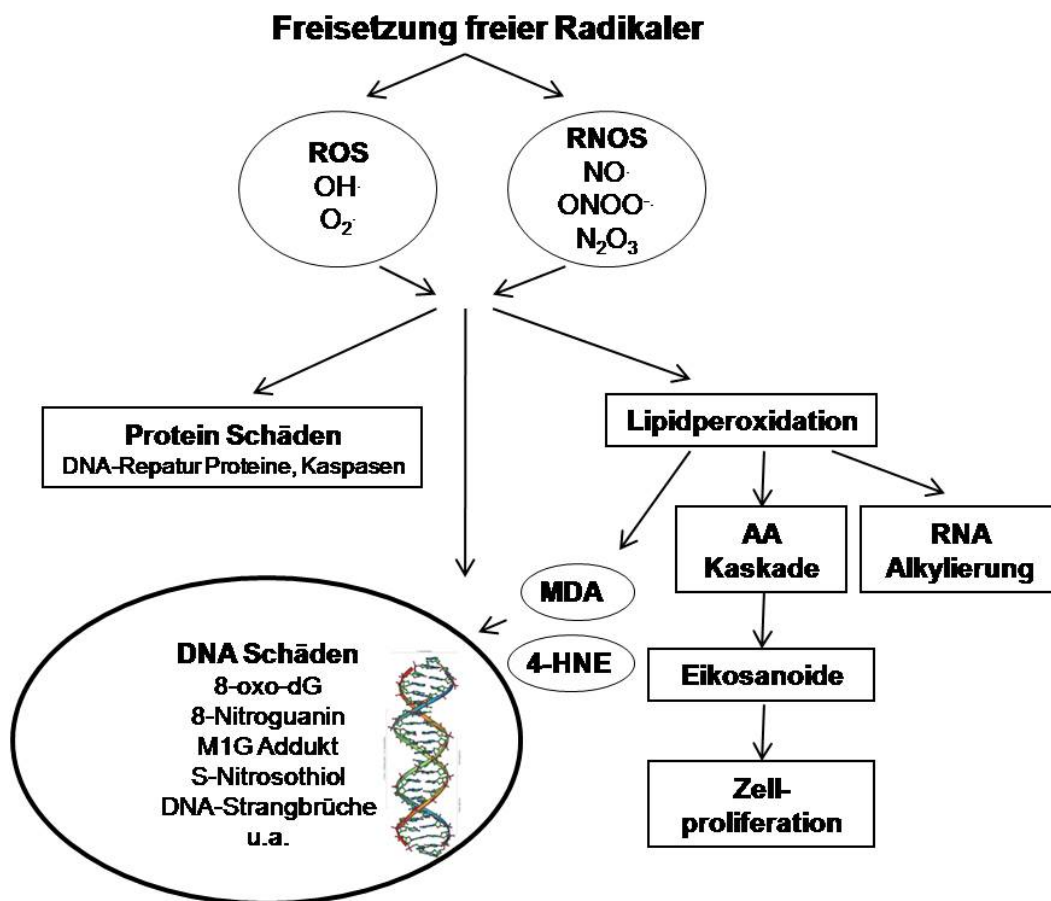


Abbildung 3: Direkte und indirekte Auslösung von DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (adaptiert nach Hussain et al., 2003 [26]). Durch Freisetzung freier Radikaler kommt es zur Bildung von ROS und RNOS (Stickstoff Sauerstoff reaktive Spezies), die Lipidperoxidation und die Oxidation von Arachidonsäure (die zu Induktion der Zellproliferation führt) auslösen können. Durch Lipidperoxidation werden DNA schädigende Substanzen wie Malondialdehyd und 4-Hydroxynoneal gebildet.

Studien mit Chemikalien und ionisierender Strahlung haben ergeben, dass Hydroxyl-Radikale vor allem zur Bildung oxidierten Basen führen. Eines der Hauptprodukte dieser Oxidationsprozesse ist 8-Desoxyguanosin [27,28] das zur Bildung von Mutationen führt, da es Fehlpaarung von Basen auslöst [29].

Darüber hinaus greifen ROS in eine Reihe zellulärer Prozesse ein, die bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen, beispielsweise in Zellproliferation und -alterung, Entzündungsreaktionen und die Bildung von Metastasen [17]. Weiters beeinflussen ROS verschiedene Proteine, die für die Regulation des Zellzyklus verantwortlich sind, darunter das Tumor Suppressor Protein p53 und ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) Protein. Durch Oxidation dieser Proteine kommt es zur Inhibition der Apoptose und zur Persistenz mutierter Zellen [17]. Auch Entzündungsreaktionen können die Krebsentstehung fördern, z.B. können chronische virale Infektionen (Hepatitis B) und ein erhöhter 8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin (8-OH-dG) Wert der Leber zur Entstehung von Leberkrebs führen [30].

2.2.2. Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den häufigsten krankheitsbedingten Todesursachen in Europa und den USA [31]. Die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist ein langer Prozess und wird von einer großen Zahl von Faktoren ausgelöst.

Die Entstehung der Arteriosklerose wird durch erhöhten Blutdruck, Entzündungen, oxidativen Stress, Adipositas und Diabetes begünstigt. Geschlecht, genetische Disposition und Ethnie sowie das neuroendokrine System zählen zu den endogenen Faktoren, die zu kardiovaskulären Erkrankungen führen; auch der Lebensstil (Rauchen, Bewegung und Ernährung) hat großen Einfluss auf die Entstehung erwähnter Risikofaktoren (siehe Abbildung 4, nächste Seite).

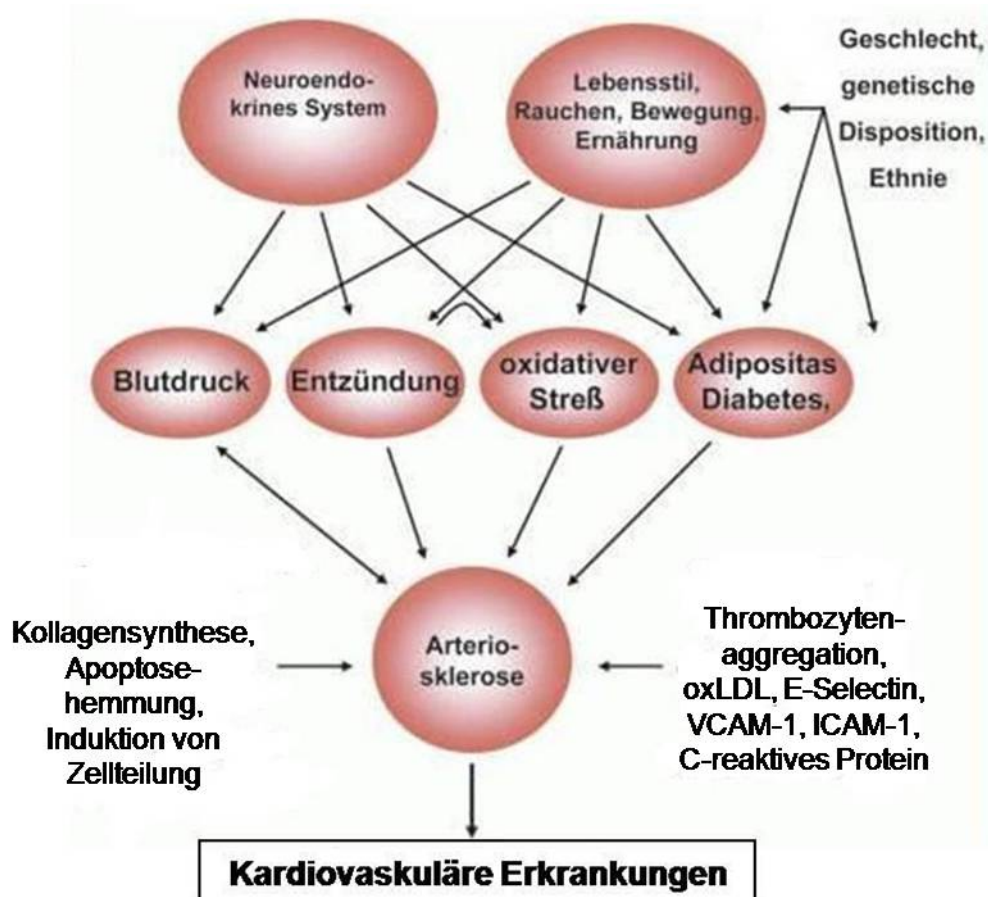


Abbildung 4: Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen (modifiziert nach Rensing, 2007 [31]). Erhöhter Blutdruck, Entzündungen, oxidativer Stress, Adipositas und Diabetes führen zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen; eine Veränderung der Thrombozytenaggregation, in die Intima aufgenommene oxidierte Lipoproteine niedriger Dichte (oxLDL), erhöhte Synthese von Zelladhäsionsmoleküle (E-Selectin, VCAM) und auch Entzündungsmarker (C-reaktives Protein) begünstigen die Ausbildung atherosklerotischer Plaques. Auch vermehrte Kollagensynthese, Apoptosehemmung und Induktion von Zellteilung sind kausale Faktoren in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen.

Die Bildung von Superoxidradikalen in Folge erhöhter Plasmaglukose-, Tumor Nekrose Faktor α oder Angiotensin II Werte führt zum Abbau vasodilatorisch wirksamer Moleküle (Stickstoffmonoxid) in Endothelzellen. Dies hat den Verlust der endothel-abhängigen Vasorelaxation zur Folge und führt zur Freisetzung von Adhäsionsmolekülen aus dem Endothelium, welche die Anheftung entzündlicher Zellen begünstigen. Die Anlagerung von Entzündungsmediatoren an bereits geschädigte Endothelien führt zur Migration dieser Zellen in das darunter liegende Gewebe, in dem der Prozess der Atherogenese durch eine Abfolge an Interaktionen von Endothelzellen mit glatter Muskulatur und Fibroblasten fortgeführt wird [32]. Erhöhter oxidativer Stress führt zur Oxidation von Lipoproteinen

niedriger Dichte (LDL), die durch diese strukturelle Modifikation veränderte biochemische Eigenschaften erhalten. Dies führt zur Phagozytierung durch Makrophagen, zur Bildung sogenannter „fatty streaks“ und Schaumzellen (siehe Abbildung 5), die letztendlich zur Entstehung von atherosklerotischen Plaques führen [2].

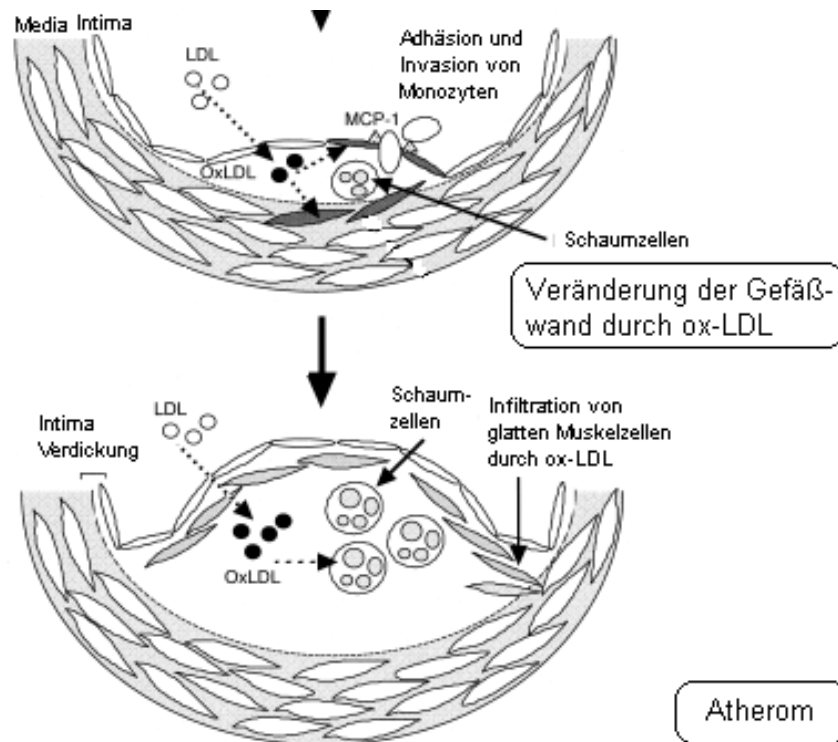


Abbildung 5: Auswirkungen der LDL-Oxidation auf die Entstehung von atherosklerotischen Plaques (modifiziert nach Itabe et al., 2003 [33])

Infolge der Prozesse der Atherogenese kommt es im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zu akuten Koronarsyndromen (Angina Pectoris, Myokardinfarkt, plötzlicher ischämischer Herztod), die durch einen thrombotischen Verschluss, der eine Reduktion des koronaren Blutflusses verursacht, hervorgerufen werden [34].

2.2.3. Neurodegenerative Erkrankungen

Weltweit leiden circa 370 Millionen Menschen an Erkrankungen des Zentralnervensystems, den größten Anteil haben Demenz, Alzheimer und Parkinson [35].

Das Gehirn reagiert im Vergleich zu anderen Organen besonders empfindlich auf oxidativen Stress [7,36]. Dies hat mehrere Ursachen: a) Das Gehirn hat einen hohen Anteil an leicht oxidierbaren Substraten wie mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Katecholaminen,

b) die Konzentration von Antioxidantien wie Glutathion und Vitamin E ist relativ niedrig, c) aufgrund des hohen Sauerstoffkonsums des Gehirns kommt es zur vermehrten Bildung endogener ROS [37], d) in manchen Hirnregionen wie dem *Globus pallidus* und der *Substantia nigra* ist Eisen in hohen Konzentrationen vorhanden, und e) das Zentralnervensystem enthält nicht replikationsfähige Neuronen, die, wenn sie geschädigt sind, eine permanente Dysfunktion aufweisen oder in den programmierten Zelltod (Apoptose) übergehen [36].

Zu den ROS-assoziierten Erkrankungen des Nervensystems zählen die lethalen Krankheiten *Amyotrophe Lateralsklerose*, die durch eine progressive Paralyse durch Degeneration der Motorneuronen ausgelöst wird, sowie *Chorea Huntington*, eine autosomal dominante Erbkrankheit, bei der es neben neuropsychologischen und motorischen Beeinträchtigungen auch zu psychischen Manifestationen kommt [36]. Zu den bekanntesten Vertretern dieser Erkrankungsgruppe zählen *Multiple Sklerose*, eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems, *Morbus Parkinson* und *Morbus Alzheimer*.

Parkinson ist eine der häufigsten progressiven neurodegenerativen Erkrankungen; rund 1% der Bevölkerung über 65 Jahren in den USA ist davon betroffen. Die Krankheit ist durch eine Beeinträchtigung der motorischen Fähigkeiten wie Bradykinesia, Ruhetremor, Versteifung und einer Abnormalität der Fortbewegung charakterisiert. Zu den nicht-motorischen Symptomen zählen Demenz, Depressionen, Psychosen und Beeinträchtigungen der olfaktorischen und visuellen Wahrnehmung [38].

Schätzungen gehen davon aus, dass weltweit 24 Millionen Menschen von Alzheimer betroffen sind [39], einer Erkrankung, die meist nach dem fünfzigsten Lebensjahr auftritt. Zu den Symptomen zählen Störungen der kognitiven Fähigkeiten, ein zunehmender Verlust des Erinnerungsvermögens, Desorientierung und Demenz [36].

2.2.4. Beeinflussung von Alterungsprozessen und des Immunsystems

Die Ursachen des Alterungsprozesses beschäftigen die Wissenschaft bereits seit Jahrhunderten, und bis heute sind die Mechanismen, die ihm zugrunde liegen, nicht vollständig geklärt. Eine weit verbreitete Theorie basiert auf der Annahme eines Zusammenhangs zwischen Alterung und oxidativem Stress: Man geht davon aus, dass es im

Laufe der Zeit durch die Zunahme oxidativer Schäden zu einer Abnahme der physiologischen Funktionen eines Organismus kommt [40,41].

Die Lebensspanne von Zellen hängt von der Länge ihrer Telomere, den Chromosomenenden, ab. Da den meisten somatischen Zellen Telomerasen, die die Telomere verlängern, fehlen (Ausnahme sind z.B. Krebszellen), kommt es bei jeder Zellteilung zu ihrer Verkürzung und damit zur natürlichen Alterung [42]. Darüber hinaus wird durch oxidativen Stress u.a. auch frühzeitige Alterung ausgelöst. Ergebnisse von Studien deuten darauf hin, dass die Verkürzung der Telomere von dem Verhältnis von ROS und Antioxidantien abhängt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Telomere Einzelstrang-DNA enthalten, die besonders empfindlich gegenüber ROS ist [43].

Das Ausmaß oxidativer DNA Schäden hängt mit der Stoffwechselrate zusammen; je aktiver der Metabolismus in einem Organismus ist, desto höher sind die Konzentrationen der ROS und desto kürzer ist seine Lebensspanne [44-46].

In *In-vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass humane Fibroblasten bei Sauerstoffmangel eine längere Lebensdauer [47] und im Gegensatz dazu unter hohen Sauerstoffkonzentrationen eine reduzierte Lebensspanne und eine beschleunigte Reduktionsrate der Telomere aufweisen [42]. Man nimmt daher an, dass Faktoren, die die Resistenz gegenüber oxidativem Stress erhöhen, zu einer verlängerten Lebensspanne führen. Tatsächlich konnte diese Annahme in einer Reihe von Studien mit genetisch veränderten Organismen (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, Mäuse) bestätigt werden [48].

Verringerte Nahrungsaufnahme führt zu einer Verlängerung der Lebenszeit. In Nagetieren konnte man eine Abnahme einer Vielzahl von alterungsbedingten Erkrankungen durch Kalorienrestriktion nachweisen [49]. Die Ursache dieses Mechanismus liegt vermutlich in einer durch die erniedrigte Stoffwechselrate verminderten Produktion von ROS durch die Mitochondrien [49].

Die Proliferation der T- und B-Zellen, der natürlichen Killerzellen und der durch Lymphokine aktivierten Killerzellen, die für eine effiziente Abwehr von pathogenen Keimen und Tumorzellen benötigt werden, nimmt mit dem Alter und bei ROS-Belastungen ab, im fortgeschrittenen Alter es kommt zu einer Zunahme der Produktion proinflammatorischer Zytokine (z.B. $\text{TNF-}\alpha$ und PGE_2) [50]. Auch in diesem Fall hat die Restriktion der Kalorienaufnahme möglicherweise positive Auswirkungen, da sie u.a. auch zur Zunahme der

Reaktionsfähigkeit der T-Lymphozyten und zu einer Erhöhung der zellulären Antioxidantien führt [2].

Auf zellulärer Ebene wird vor allem NFκB, ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation inflammatorischer und oxidativ wirkender Moleküle beteiligt ist, für die im Alter durch ROS ausgelösten Reaktionen des Immunsystems verantwortlich gemacht [50]. Abbildung 6 gibt einen Überblick über oxidative und inflammatorische Reaktionen, die bei Alterungsprozessen eine Rolle spielen.

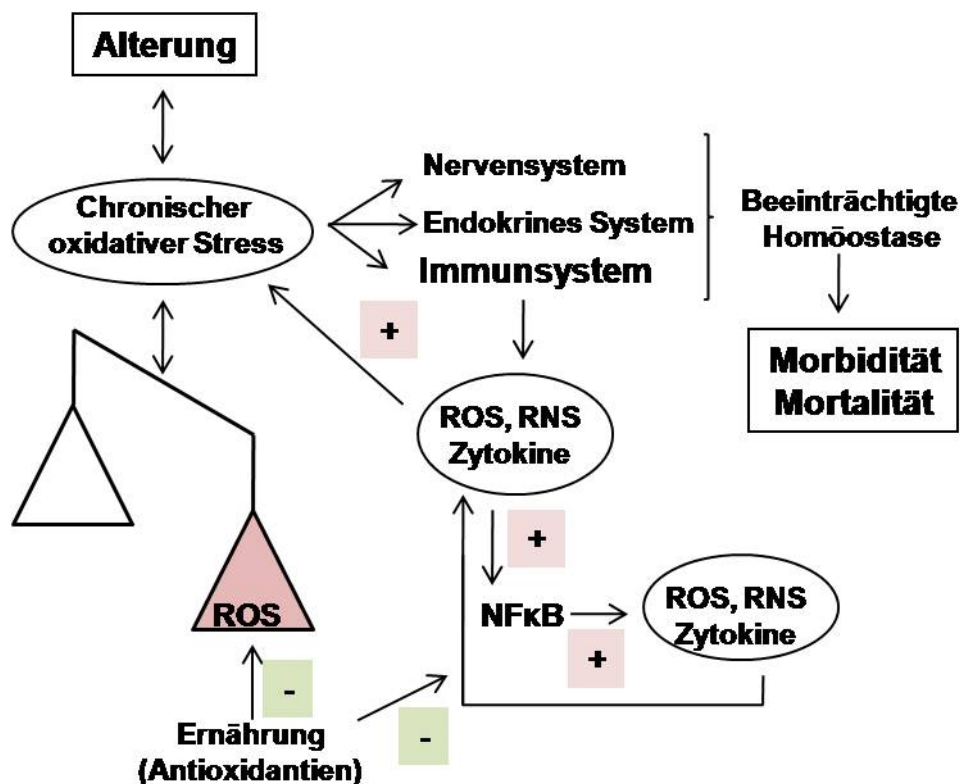


Abbildung 6: Überblick über oxidative und inflammatorische Prozesse und Zusammenhänge mit Alterungsprozessen (modifiziert nach De la Fuente et al., 2005 [50]). Der Alterungsprozess ist durch chronischen oxidativen Stress und vermehrtes Auftreten von ROS charakterisiert. Das Ungleichgewicht des oxidativen Systems hat Auswirkungen auf das Nervensystem, das endokrine System und das Immunsystem. Durch Reaktionen des Immunsystems kommt es zur Entstehung von ROS, RNS (reaktive Stickstoffspezies) und inflammatorischer Zytokine, die den Transkriptionsfaktor NFκB aktivieren. NFκB produziert weitere inflammatorisch wirksame Moleküle, wodurch es zu einem Kreislauf der ROS-Entstehung kommt. Durch Nahrungsmittel, die reich an Antioxidantien sind, ist es möglich, endogen verursachtes oxidatives Ungleichgewicht auszugleichen.

2.2.5. Weitere Auswirkungen von oxidativem Stress

ROS haben neben den oben erwähnten Erkrankungen auch Auswirkungen auf eine Reihe weiterer Funktionen im menschlichen Organismus, u.a. auf die Fertilität, und lösen auch diverse Augenerkrankungen aus.

Sowohl männliche als auch weibliche Infertilität steht mit oxidativem Stress in Zusammenhang. ROS beeinflussen die Qualität der Keimzellen und deren Entwicklung. Eine Reihe von Human- und Tierstudien beschäftigte sich mit der Rolle von ROS in der Entstehung und Reifung von Oozyten, follikulärer Atresie, der Funktion des Corpus luteum und der Luteolyse [3,4,51].

Auch Katarakte, die durch eine Trübheit der Linse im Auge charakterisiert sind, werden durch oxidative Prozesse ausgelöst. Proteine, die im Auge enthalten sind, werden mit zunehmendem Alter oxidiert, und in einigen Studien konnte man eine erhöhte Rate an Oxidationsprodukten (mehr als 60% der Methionin-Reste in humanen Katarakten waren oxidiert) nachweisen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in Nahrungsmitteln enthaltene Antioxidantien, wie zum Beispiel Tocopherol und Carotinoide, eine präventive Wirkung haben [2,52].

2.3. Schutzsubstanzen in der menschlichen Nahrung

Um den Menschen vor durch ROS assoziierten Erkrankungen zu schützen, versuchte man, Schutzsubstanzen in der Nahrung zu finden; neben antioxidativ wirkenden Vitaminen wurde eine Vielzahl von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen identifiziert, die ROS inaktivieren.

Zu den bekanntesten Antioxidantien in Nahrungsmitteln zählen Vitamin C, Tocopherole, Phenole und Carotinoide und Phenole. Die Gruppe der Carotinoide und Flavonoide lässt sich in viele verschiedene Vertreter, die sich durch ihren strukturellen Aufbau unterscheiden, unterteilen [53-55].

In den folgenden Kapiteln wird auf drei spezielle Antioxidantien, nämlich Grüntee-Extrakt, Gallussäure und Vitamin C näher eingegangen. In der vorliegenden Arbeit wird vor allem die Auswirkung dieser drei Antioxidantien auf oxidative DNA-Schäden (8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin und DNA-Strangbrüche), die zu Mutationen führen können,

beschrieben. 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8-Oxo-dG) entsteht durch Oxidation der DNA-Base durch ROS. Durch diese Oxidation kommt es zu GC→TA Transversionen, die zur Bildung transformierter Zellen führen [56]. Ein weiterer Biomarker für oxidative DNA-Schäden sind DNA-Strangbrüche, die mit Hilfe des Einzellzellelektrophoresetests (SCGE-Tests) erfasst werden können.

2.3.1. Grüntee

Tee ist das nach Wasser weltweit am meisten konsumierte Getränk, noch weit vor Kaffee, Bier, Wein und „Soft“-Drinks [57]. Grüner und schwarzer Tee werden aus *Camellia sinensis*, dem Teestrauch, gewonnen. Der Unterschied zwischen den Teesorten liegt in ihrer Herstellung: Beim schwarzen Tee werden die Blätter fermentiert, dieser Prozess, bei dem Enzyme, u.a. die Polyphenoloxidasen, mit Tanninen und Catechinen reagieren [58], wird bei der Herstellung von grünem Tee durch Dämpfung der Blätter ersetzt. Dadurch kommt es zu einer Inaktivierung der Polyphenoloxidase und zu einer Konservierung der Polyphenole [58]. In den folgenden Kapiteln wird auf die Zusammensetzung von grünem Tee und seine biomedizinischen Eigenschaften näher eingegangen.

2.3.1.1. Zusammensetzung von Grüntee

Grüntee (GT) enthält hauptsächlich Polyphenole, die 30-40% der extrahierbaren Masse der getrockneten Grüntee-Blätter bilden. Der Großteil dieser Verbindungen gehört zur Gruppe der Catechine [58,59]. Die wichtigsten Vertreter im GT sind Epicatechin (EC), Epicatechin-3-gallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) (siehe Abbildung 7) [59].

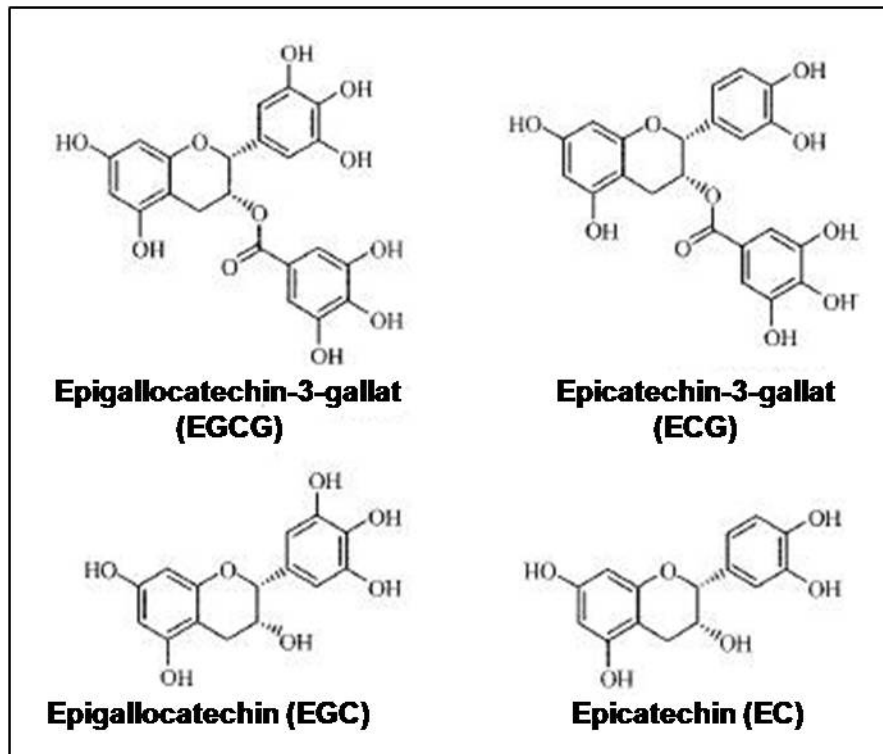


Abbildung 7: Struktur der im Grüntee vorkommenden Catechine (modifiziert nach Lambert et al., 2007 [60])

Die Hauptsubstanz in GT ist EGCG, es macht circa 16,5 Gewichtsprozent der durch Wasser extrahierbaren Menge des Tees aus [61]. Andere bioaktive Verbindungen sind Chlorogensäure und Theogallin, das nur in Tee vorkommt [62], sowie Chinasäure, Carotenoide, Trigalloylglucose, Lignin, Protein, Chlorophyll, Mineralien, Caffein und geringe Mengen von Methylxanthinen wie Theophyllin, Theobromin und Theanin [62].

Catechine haben von allen Polyphenolen im GT die höchste Bioverfügbarkeit. Die Ergebnisse einer Studie über die Absorption und Verteilung von Catechinen in Ratten deuten darauf hin, dass EGCG schlechter absorbiert wird als EGC und EC und primär über die Galle ausgeschieden wird, während die übrigen Catechine auch im Harn ausgeschieden werden [63]. Polyphenole werden nach Absorption metabolisiert, es kommt u.a. zu Methylierung, Glucuronierung, Sulfatierungen und zur Ringspaltung [60], wobei die Stoffwechselprodukte 4'-O-Methyl-EGC und 4'-O-methyl-EGCG bzw. EGCG-4''-O-glucuronid entstehen [60].

2.3.1.2. Auswirkung von Grüntee auf die menschliche Gesundheit

Man geht davon aus, dass GT eine Rolle in der Prävention einer Reihe von Erkrankungen mit oxidativer Ätiologie wie Krebs, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen spielt [64].

Die molekularen Mechanismen, die den antioxidativen Effekten von GT zugrunde liegen, sind durch die chemischen Strukturen seiner Inhaltsstoffe bedingt: Die phenolischen Hydroxylgruppen der aromatischen Ringsysteme von EC, EGC und EGCG können ROS abfangen [65].

Sowohl in epidemiologischen Studien als auch in Tiermodellen wurde eine schützende Wirkung von GT vor der Entstehung von Haut-, Brust- Prostata-, Lungen-, Magen-, Dickdarm- und Leberkrebs gefunden [66-69]. In einer große Kohortenstudie mit 34.651 postmenopausalen Frauen („Iowa Women’s Health Study“) fand man eine signifikante inverse Korrelation zwischen der Catechin-Aufnahme aus Lebensmitteln und der Inzidenz rektaler Krebserkrankungen [70].

Die positiven Wirkungen des GT sind vor allem auf EGCG zurückzuführen, dieses inhibiert die Entstehung von Tumoren in diversen Organen wie Lunge, Blase, der Haut, im Dünndarm, der Prostata und in der Brust [68,69,71-73].

Weiters wirken GT und EGCG anti-angiogenetisch (sie verhindern das Wachstum von Blutgefäßen die Tumore versorgen) [74,75] und anti-mutagen [76,77].

2.3.1.3. Schutz vor oxidativen DNA-Schäden durch Grüntee

Tabelle 1 gibt einen Überblick über Humanstudien, in denen die Auswirkung von GT, Grüntee-Extrakt (GTE) und EGCG auf oxidative DNA-Schäden untersucht wurde. Mit dem Einzelzellgelelektrophoresetest konnte in einer Studie mit 2 Tassen GT pro Tag über einen Zeitraum von 42 Tagen eine Reduktion der DNA-Strangbrüche beobachtet werden [78], auch in einer kleinen Pilotstudie (n=6) wurde eine Verminderung der DNA-Schäden in Mundschleimhautzellen gefunden [79]. In Studien, in denen 8-Oxo-dG als Parameter für oxidativen Stress herangezogen wurde, konnte nicht in allen Fällen eine DNA-protective Wirkung von Grüntee festgestellt werden. Beispielsweise wurde nach einem Monat Verabreichung von 500 mg und 1000 mg Grüntee-Polyphenolen (GTP) pro Tag keine

Veränderung dieses Parameters gefunden, nach drei Monaten hingegen wurde eine Reduktion von 8-Oxo-dG im Urin festgestellt [80].

Tabelle 1: Verhinderung oxidativer DNA-Schäden durch Grüntee in Humanstudien¹

Studiendesign	Dosierung	Dauer	Endpunkt	Effekt	Ref.
n=12 ♀ (NR) Paralleldesign mit Kontrolle	2 Tassen GT/T (160mg GTE/Tasse)	42 T	DNA-Strangbrüche in Lymphozyten (SCGE) TEAC im Plasma	↓ Strangbrüche	[78]
<i>ex vivo</i> Studie Heparinisiertes Vollblut (NR, ♂)	10 ⁻⁸ bis 10 ⁻³ M EGCG	20 min	DNA-Strangbrüche in Lymphozyten (SCGE)	↓ Strangbrüche (10 ⁻⁸ bis 10 ⁻⁵ M) ↑ Strangbrüche (10 ⁻³ M)	[81]
n=6 (R, NR) sequentielle Studie	5 Tassen/T (400-500 mg GTE/Tasse)	28 T	Mundschleimhautzellen (DNA Schäden, -Addukte, oxidierte Basen, Zellwachstum, DNA Gehalt, Apoptose)	↓ * DNA-Schäden (R)	[79]
n=40, Probanden mit erhöhtem Risiko für HCC, Paralleldesign mit Placebo	500 mg GTP/T (1) 1000 mg GTP/T (2)	90 T	8-Oxo-dG im Urin (HPLC-EC)	↔ 8-Oxo-dG nach 1m (1 und 2) ↓ 8-Oxo-dG nach 3m (1 und 2)	[80]
n=16 ♂ (8R, 8NR) Crossover Studie mit Kontrolle	200 mg GTE/T	21 T	8-Oxo-dG im Urin (HPLC-EC)	↔ 8-Oxo-dG	[82]
n=36 (R) Paralleldesign mit Kontrolle	4 Tassen GT/T	120 T	8-Oxo-dG im Urin (ELISA)	↓ 8-Oxo-dG	[83]
n=20 ♀ (R) Paralleldesign mit Kontrolle	2x150 ml GT/T (3g GT/150 ml)	7 T	8-Oxo-dG im Urin und Leukozyten (HPLC-EC)	↓ * 8-Oxo-dG nach GT Konsum	[84]

1 Abkürzungen: EC-Elektrochemische Detektion, EGCG-Epigallocatechin-3-gallat, ELISA-Enzyme linked immuno sorbent assay, GT-Grüntee, GTE-Grüntee-Extrakt, GTP-Grüntee Polyphenole, HCC-Hepatozelluläres Carcinom, HPLC-Hochleistungsflüssigkeitschromato-graphie, min-Minuten, n=Anzahl Studienteilnehmer pro Interventionsgruppe, Crossover Studien: n= Gesamtanzahl der Studienteilnehmer, 8-oxo-dG- 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin, NR-Nichtraucher R-Raucher, Ref.- Referenzen SCGE- Einzelzellgelelektrophoresetest, T-Tage, ↑ signifikante Zunahme (p<0,05) ↓ signifikante Abnahme (p<0,05), * keine Angabe des p-Wertes, ↔ keine Änderungen

In Tabelle 2 sind Studien aufgelistet, in denen die Auswirkung von GT auf oxidative DNA-Schäden in Tierstudien untersucht wurde.

Tabelle 2: Verhinderung oxidativer DNA-Schäden durch Grüntee in Tierstudien¹

Studiendesign	Dosierung	Dauer	Endpunkt	Effekt	Ref.
M , n=4 GTP mit Magensonde	GTP 200 mg/kg KG TBT GTP 100 mg/kg KG + TBT GTP 200 mg/kg KG + TBT	7 T	DNA- Strangbrüche in peripherem Blut (SCGE)	↓ Strangbrüche (GTPP + TBT vs. TBT Kontrolle)	[85]
R , n=8 sc. Injektion von DMH (carcinogen in Leber und Colon) nach GTE, GTE im TW	Wasser + 25 mg DMH Wasser +50 mg DMH Wasser +100 mg DMH GTE 0,05% GTE + 25 mg DMH 0,05% GTE + 50 mg DMH 0,05% GTE + 100 mg DMH	10 T	8-Oxo-dG in Kolon und Leber	↓ 8-Oxo-dG im Kolon (alle GTE) ↔ 8-Oxo-dG in Leber (alle GTE)	[86]
R , n=11 EGCG im Futter	50 mg EGCG/kg/T (1) (entspricht 2 Ta. GT) 500 mg EGCG/kg/T (2) (entspricht 20 Ta. GT)	180 T	8-Oxo-dG im Plasma (ELISA)	↓ 8-Oxo-dG : (2) im Vergleich zur Kontrolle und (1)	[87]
R , n=5 GTE / CE im TW, ip Injektion von 2-NP (kanzerogen)	2-NP 2-NP + GT (2% im TW) 2-NP + CE (2% im TW)	14 T	8-Oxo-dG in Leber	↓ 8-Oxo-dG (GT und CE)	[88]
R , n=5 GT im TW, 7 T vor 2- NP, 14T GT + 2-NP	2-NP GT 2% + 2-NP	21 T	8-Oxo-dG in Leber (HPLC-EC)	↓ 8-Oxo-dG	[89]
M , n=10 GT oder EGCG im TW	2% GT + NNK 560 ppm EGCG + NNK NNK	91 T	8-Oxo-dG in Lunge und Leber (HPLC- UV)	↓ * 8-Oxo-dG in Lunge (GT und EGCG) ↔ 8-Oxo-dG in Leber (GT und EGCG)	[90]

1 Abkürzungen: **CE**- Catechin-Extrakt, **DMH**-1,2-Dimethylhydrazin, **EC**-Elektrochemische Detektion, **EGCG**-Epigallocatechin-3-gallat, **ELISA**- Enzyme linked immunosorbent Assay, **GT**-Grüntee, **GTE**-Grüntee-Extrakt, **GTP**-Grüntee Polyphenol, **HPLC**- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, **ip**-intraperitoneal, **M**-Maus, **n**= Anzahl Tiere/Gruppe, **NNK**-4-(Methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone- **2-NP**-2-Nitropropan, **R**-Ratte, **sc**- subcutan, **Ref.**- Referenzen, **SCGE**-Einzelzellgelelektrophoresetest, **T**-Tage, **Ta**-Tassen **TBT**-Tributyltin, **TW**-Trinkwasser, **UV**-Ultraviolett Detektion, ↓ signifikante Abnahme (p<0,05), * keine Angabe des p-Wertes, ↔ keine Änderungen

In der Mehrzahl der Tierstudien wurden hohe Dosierungen verabreicht (die bis zu 50 Tassen GT beim Menschen entsprechen) und oxidativer Stress durch Chemikalien induziert. In den meisten Fällen wurden DNA-protektive Effekte mit GT beobachtet. Beispielsweise fanden Liu et al. [85] eine Reduktion der DNA-Strangbrüche in peripherem Blut von Mäusen bei gleichzeitiger Verabreichung von 100 mg bzw. 200 mg GTP/kg KG und Tributyltin über einen Zeitraum von 7 Tagen. Meng et al. [87] konnten erst bei einer Verabreichung von einer Menge, die 20 Tassen GT entspricht, über 5 Monate hinweg eine Reduktion von 8-Oxo-dG im Vergleich zur Kontrollgruppe und einer Gruppe, die mit 2 Tassen GT pro Tag behandelt wurde, beobachten.

2.3.2. Gallussäure

Gallussäure (GA) ist der Trivialname für 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure (Abbildung 8). Es handelt sich um ein natürliches Polyphenol, das in Pflanzen vorkommt [91]. GA ist der Baustein der pflanzlichen Gerbstoffgruppe der Gallotannine, besonders hohe Konzentrationen finden sich in rotem Wein, Mango, Rhabarber und Johannisbrotmehl (Carob) und auch in GT [62,92-94].

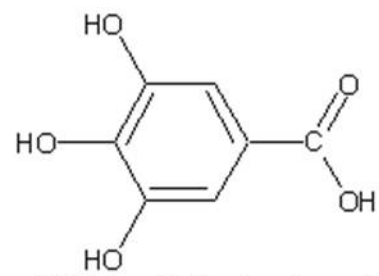


Abbildung 8: Strukturformel der Gallussäure

GA wird in verarbeiteten Lebensmitteln, Kosmetika und Nahrungsmittelverpackungsmitteln verwendet, um das Ranzigwerden und Verderben von Lebensmitteln durch Oxidationsprozesse zu verhindern [95].

Das Hauptstoffwechselprodukt der GA im menschlichen Organismus und im Organismus von Ratten ist 4-O-Methylgallussäure (4OMGA) [96].

GA besitzt antioxidative, antiallergische, anti-mutagene, anti-cancerogene, antimikrobielle und anti-inflammatorische Eigenschaften [97-103]. Sie kann Proteine und Mineralien wie Zink, Eisen und Calcium binden und so deren Bioverfügbarkeit durch Komplexbildung beeinflussen [104-106].

Die Schutzeffekte der GA vor oxidativen DNA-Schäden wurden erst in wenigen Studien untersucht (siehe Tabelle 3). Ferk und Mitarbeiter konnten sowohl in einer Humanstudie als auch in einer Tierstudie *in vivo* eine Reduktion der DNA-Strangbrüche nach 3-tägiger Verabreichung von 0,2 mg GA/kg feststellen [11]. Die DNA-schützende Wirkung der GA konnte in Versuchen mit einer einmaligen, sehr hohen Gabe von 80 mg/kg 30min vor einer γ -Bestrahlung bestätigt werden [107]. Auch in *Ex-vivo*-Experimenten konnte eine Reduktion der DNA-Migration nach exogener ROS-Belastung (γ -Bestrahlung bzw. H_2O_2) beobachtet werden [107,108].

Tabelle 3: Auswirkungen von Gallussäure auf oxidative DNA-Schäden¹

Studiendesign	Dos.	Dauer	Endpunkte	Effekt	Ref.
H , <i>in vivo</i> , n=8 Paralleldesign mit Placebo	0,2 mg/kg KG	3 T	DNA-Strangbrüche nach <i>ex vivo</i> Behandlung mit H ₂ O ₂ , oxidierte Purine (FPG) und Pyrimidine (Endo III) (SCGE) in Lymphozyten	↓ Strangbrüche nach H₂O₂ ↓ oxidierte Purine ↓ oxidierte Pyrimidine	[11]
R , <i>in vivo</i> , n=3 GA im Trinkwasser	0,2 mg/kg KG	3 T	DNA-Strangbrüche (SCGE) nach γ-Bestrahlung (7 Gy, ⁶⁰ Co) in Lymphocyten, Colonocyten, Hepatocyten und Lunge	↓ Oxidierte Purine in Colon, Leber, Lunge und Blut ↓ Oxidierte Purine und Pyrimidine in Lunge und Blut (nach Bestrahlung) ↓ Strangbrüche in Colon und Blut (nach Bestrahlung) ↓ Oxidierte Pyrimidine in Colon (nach Bestrahlung)	[11]
M , <i>in vivo</i> , n=5 GA ip 30 min vor Bestrahlung	80 mg/kg KG	1x	DNA-Strangbrüche in Leukozyten nach γ-Bestrahlung (4 Gy, ⁶⁰ Co) (SCGE)	↓ * Strangbrüche	[107]
<i>Ex vivo</i> , humane Leukozyten	50 μM 100 μM		DNA-Stranbrüche nach γ- Bestrahlung (2Gy, ⁶⁰ Co)	↓ * Strangbrüche	[107]
<i>Ex vivo</i> , humane Lymphozyten	0,1 μg/L 1 μg/L 10 μg/L	5 min	DNA-Strangbrüche nach H ₂ O ₂ , oxidierte Purine (FPG) (SCGE)	↓ Strangbrüche nach H₂O₂ ↓ oxidierte Purine	[108]

1 Abkürzungen: **H**- Humanstudie, **M**- Mäuse, **min**-Minuten, **n**- Anzahl Tiere/Gruppe, **R**- Ratten, **SCGE**-Einzelzell-elektrophoretet, **T**-Tage, ↓ signifikante Abnahme (p<0,05), * keine Angabe des p-Wertes

2.3.3. Vitamin C

Unter „Vitamin C“ werden Verbindungen eines Redoxsystems verstanden, es besteht aus L-Ascorbinsäure (welche in dieser Studie herangezogen wurde), deren Monanion Ascorbat, der in Form eines freien Radikals als Zwischenprodukt auftretenden Semidehydro-L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-Ascorbinsäure [109]. Ascorbinsäure (Abbildung 9) besetzt zwei ionisierbare Gruppen (pKa 4,25 und pKa 11,8), und liegt, mit Ausnahme des Magens, im menschlichen Körper als Monoanion (Ascorbat) vor [110].

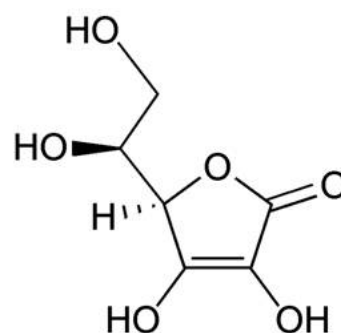


Abbildung 9: Strukturformel der Ascorbinsäure

Die wichtigsten Quellen von Vitamin C (VC) sind frische Gemüse und Früchte bzw. deren Säfte; besonders viel findet sich in Sanddorn, Johannisbeeren, Kiwi, Paprika und

Zitrusfrüchten [111]. VC ist eine wasserlösliche und gut absorbierbare Substanz, die viele biologische Funktionen erfüllt, sie ist Cofaktor vieler Enzyme, die u.a. an der post-translationellen Hydroxylierung von Kollagen, der Biosynthese von Carnitin, der Konvertierung des Neurotransmitters Dopamin zu Norepinephrin, den Peptid-Amid-Bildungen und dem Tyrosin Metabolismus beteiligt sind. Darüber hinaus reguliert VC die Eisenaufnahme. [112].

VC hat reduzierende Eigenschaften und ist in der Lage, ROS in biologischen Systemen abzufangen (für Übersichtsarbeiten siehe Rose und Bode, 1993 [113] und May, 1999 [114]). As wandelt sich in einem ersten Oxidationsschritt zum Ascorbat-Radikal um, durch einen zweiten Oxidationsschritt entsteht Dehydroascorbat (Abbildung 10) [112].

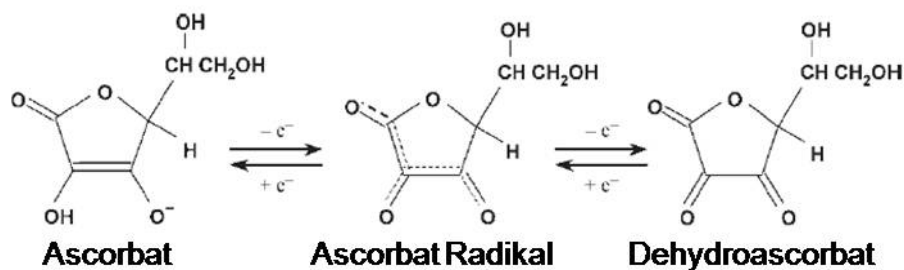


Abbildung 10: Redox-Reaktion von Vitamin C (modifiziert nach Duarte und Lunec, 2005 [112]). Die Oxidation von Ascorbat führt zur Bildung des Ascorbat Radikals, das in einem weiteren Oxidationsschritt zu Dehydroascorbat umgewandelt wird.

VC kann auch andere wichtige antioxidative Moleküle, wie α -Tocopherole und Glutathion, regenerieren [112].

Neben Studien, in denen man antioxidative Eigenschaften von VC nachweisen konnte, gibt es auch Hinweise auf prooxidative Effekte. Vor allem in *In-vitro*-Studien wurde DNA-Schädigung durch VC nachgewiesen [115-118]. Die zugrunde liegende Reaktion könnte die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} sein, das H_2O_2 zu Hydroxylradikalen reduziert (Fenton Reaktion). Diese Bildung von Hydroxylradikalen wird im menschlichen Körper durch Bindung von Fe^{2+} an Ferritin und Transferritin verhindert, dennoch wird Menschen mit hohen Eisenwerten abgeraten, VC-Supplementierung einzunehmen [119].

Tabelle 4 (Seite 23) gibt einen Überblick über Humanstudien hinsichtlich der Auswirkungen von VC auf oxidative DNA-Schäden. In der Mehrheit der Untersuchungen wurde keine Reduktion der DNA-Schäden gefunden. Von sieben Studien, in denen mittels

SCGE-Tests die Veränderung der DNA-Strangbrüche nach VC-Konsum gemessen wurde, konnte man nur in zweien eine eindeutig protektive Wirkung und eine Reduktion der DNA-Migration feststellen. In den Untersuchungen, in denen eine einmalige Dosis von 500 mg bzw. 1000 mg VC verabreicht wurden, konnte sowohl eine Abnahme der Einzelstrangbrüche als auch der durch ionisierende Bestrahlung bzw. Wasserstoffperoxid hervorgerufenen DNA-Strangbrüche beobachtet werden [120,121]. In einer Reihe anderer Experimente hingegen konnte keine Veränderung der Strangbrüche durch VC festgestellt werden [122-125].

In den Interventionsstudien, in denen 8-Oxo-dG als Marker für oxidative DNA-Schäden beobachtet wurde, ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den SCGE-Tests. Lee et al. [126] konnten nach 4-wöchiger Verabreichung von 500 mg VC pro Tag eine Abnahme von 8-oxo-dG in mononukleären Blutzellen feststellen, der Effekt war jedoch nicht signifikant; in einer anderen Studie mit der gleichen Konzentration (Dauer: 6 Wochen) kam es zu einer signifikanten Abnahme von 8-Oxo-dG in Lymphozyten, aber auch zu einer signifikanten Zunahme von 8-Oxo-A in Lymphozyten und 8-Oxo-dG in Serum und Harn [127,128]. Diese Zunahme der DNA-Schäden im Serum konnte in einem ähnlichen Experiment mit Patienten, die an systemischem Lupus leiden, bestätigt werden [129]. Vojdani et al. [130] fanden nach Gabe von 1000 mg VC, nicht aber nach 500 mg VC eine Abnahme von 8-Oxo-dG. Neben den zuletzt erwähnten Untersuchungen, in denen eine Änderung dieses Parameters festgestellt werden konnte, gibt es eine Reihe von Studien, in denen VC keinerlei Auswirkungen zeigte [119,131,132].

Tabelle 4: Untersuchung antioxidativer Eigenschaften von Vitamin C in Humanstudien¹

Studiendesign	Dosierung	Dauer	Endpunkt	Effekt	Ref.
n=6, sequentielle Studie	500 mg	1x	DNA Strangbrüche in Leukozyten mit / ohne <i>ex vivo</i> ionisierender Bestrahlung (SCGE)	↓ Endogene Strangbrüche (1h nach VC) ↓ Strangbrüche (1h nach VC) (Bestrahlung)	[120]
n=12 (R, NR) sequentielle Studie	1000 mg	1x	DNA Strangbrüche in Lymphozyten mit/ohne <i>ex vivo</i> H ₂ O ₂ Behandlung (SCGE)	↓ * Strangbrüche (H ₂ O ₂) 6h nach VC ↓ Endogene Strangbrüche (2-4h nach VC)	[121]
n=9 ♂ (NR) Parallel-design mit Placebo	60 mg, jeden zweiten Tag	21 T	DNA Strangbrüche in Lymphozyten mit/ohne <i>ex vivo</i> H ₂ O ₂ Behandlung (SCGE)	↔ Endogene Strangbrüche ↔ Strangbrüche (H ₂ O ₂)	[123]
n=12 (NR) Crossover Studie mit Placebo, Probennahme nach 90 und 120 min	500 mg VC + 400 IU VE 500mg VC + Placebo VE, 400 IU VE + Placebo VC,	1 x	DNA Strangbrüche in Lymphozyten mit/ohne <i>ex vivo</i> H ₂ O ₂ (SCGE)	↔ Endogene Strangbrüche ↔ Strangbrüche (H ₂ O ₂)	[124]
n=8, COPD Patienten, Parallel-design mit Placebo	250 mg/T	84 T	DNA Strangbrüche in Leukozyten mit/ohne <i>ex vivo</i> H ₂ O ₂ (SCGE)	↔ Endogene Strangbrüche ↓ Strangbrüche (H ₂ O ₂)	[133]
n=21 ♂ (9 R, 12 NR), Crossover Studie mit Placebo	350 mg VC/T 350 mg VC + 250 mg VE/dT	28 T	8-Oxo-dG in mononuklearen Leukozyten DNA (HPLC), DNA Strangbrüche mit/ ohne <i>ex vivo</i> X-ray (SCGE)	↔ endogene Strangbrüche ↔ Strangbrüche (Bestrahlung) ↔ 8-Oxo-dG	[125]
n=7 (NR) sequentielle Studie	2 x 500 mg/T	42 T	DNA Strangbrüche in Lymphozyten mit /ohne <i>ex vivo</i> H ₂ O ₂ (ELISA)	↓ Strangbrüche (H ₂ O ₂) ↔ Endogene Strangbrüche	[134]
n=48 (NR) Probanden mit niedrigen/ hohen Cholesterinwerten, Crossover Studie mit Placebo	60 mg/T 6000 mg/T	14 T	DNA Strangbrüche, mit / ohne <i>ex vivo</i> H ₂ O ₂ (SCGE) Chromosomenaberrationstest mit / ohne <i>ex vivo</i> Bleomycin	↔ Strangbrüche (mit/ohne H ₂ O ₂) ↔ Chromosomenaberrationstest mit/ohne Bleomycin	[122]
n= 3 ♂(R) Parallel-design mit Placebo	500 mg/T	28 T	8-Oxo-dG in peripheren mononuklearen Blutzellen (HPLC-EC)	↔ 8-oxo-dG	[126]
n=30 (NR) sequentielle Studie und Parallel-design mit Placebo	500 mg/T	42 T	8-Oxo-A und 8-Oxo-G in Lymphozyten (GC-MS und HPLC-EC); 8-oxo-dG in Serum und Urin (ELISA)	↑ 8-Oxo-A in Lymphozyten ↓ 8-Oxo-dG in Lymphozyten ↑ 8-Oxo-dG im Serum ↔ 8-Oxo-dG im Harn	[127, 128]

Fortsetzung Tabelle 4

Studiendesign	Dosierung	Dauer	Endpunkt	Effekt	Ref.
n=20 ♂ (R) Paralleldesign mit Placebo	2x250 mg/T	60 T	8-Oxo-dG im Urin (HPLC-EC)	↔ 8-Oxo-dG	[132]
n=5 (NR) Paralleldesign mit Placebo	500 mg/T 1000 mg /T 5000 mg/T	14 T	8-Oxo-dG in Lymphozyten (HPLC-EC)	↔ 8-Oxo-dG	[130]
n=48 (NR) Paralleldesign mit Placebo	500 mg VC/T 400 IU VE/T+ 500 mg VC	60 T	8-Oxo-dG im Urin (ELISA)	↔ 8-Oxo-dG	[131]
n=40 (NR) Paralleldesign mit Placebo	80 mg/T 200 mg/T 400 mg/T	105 T	8-Oxo-dG in peripheren mononuklearen Blutzellen (HPLC-EC)	↔ 8-Oxo-dG	[119]
n=15 ♀ (NR) (SLE Patienten) Crossover Studie mit Placebo	500 mg/T	42 T	8-Oxo-dG in peripheren mononuklearen Blutzellen (HPLC-EC), Serum und Urin (ELISA)	↔ 8-oxo-dG in Blutzellen und Urin ↑ 8-oxo-dG in Serum	[129]
n= 25 (NR) HD Patienten nach Dialyse, Paralleldesign mit Placebo	300 mg/d i.v. 3x/w	56 T	8-Oxo-dG in Lymphozyten (HPLC-EC)	↓ 8-Oxo-dG	[135]
n=20 (NR) Crossover Studie mit Placebo	260 mg/T VC 260 mg/T VC +14 mg/T Fe	42 T	8-Oxo-dG isoliert von Vollblut (GC-MS)	↓ 8-Oxo-dG in beiden Gruppen (alle Änderungen auch in Placebo-Gruppe)	[136]

1 Abkürzungen: COPD- Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, EC-Elektrochemische Detektion, ELISA- Enzyme linked immunosorbent Assay, Fe- Eisen, HD-Hämodialyse, HPLC- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, i.v.- intravenös, min- Minuten, n= Anzahl Studienteilnehmer pro Interventionsgruppe, Crossover Studie: n= Gesamtanzahl der Studienteilnehmer, NR-Nichtraucher, R- Raucher, SCGE-Einzelzellgelelektrophoresetest, SLE- Systemischer Lupus, T-Tage, UV-Ultraviolett Detektion, VE- Vitamin E, w-Wochen, ↑ signifikante Zunahme (p<0,05), * keine Angabe des p-Wertes, ↔ keine Änderungen

In Tabelle 5 sind die Auswirkungen von VC auf oxidative DNA-Schäden in Tierstudien aufgelistet. In keiner der Untersuchungen konnten DNA-protective Wirkungen nachgewiesen werden; in einer Studie wurde eine Zunahme der endogenen Strangbrüche nach einmaliger bzw. doppelter Gabe von 1 mg VC/kg und 30 mg VC/kg festgestellt [137]. In den anderen Experimenten wurde kein Einfluss von VC auf oxidative DNA-Schäden beobachtet [138-140].

Tabelle 5: Untersuchung antioxidativer Eigenschaften von Vitamin C in Tierstudien

Studiendesign	Dosierung	Dauer	Endpunkt	Effekt	Ref.
R , n=6 , VC im TW, 2h bevor Tötung: sc t-bH	0,5 mg/ml (entspricht ca. 70mg/kg)	7 T	Oxidierte Purine (FPG) und Pyrimidine (Endo III) in Leber und Kolon (SCGE)	↔ oxidierte Purine ↔ Pyrimidine	[140]
M , n=6 VC per Magensonde	1 mg/kg KG (1) 30 mg/kg KG (2)	1x oder 2x	DNA Strangbrüche in peripheren weißen Blutzellen (SCGE)	↑ Strangbrüche (1+2) nach 2x VC im Vegleich zur Kontrolle ↑ Strangbrüche nach 30mg/kg als nach 1mg/kg	[137]
R , n=6 VC per Magensonde	50 mg VC/kg KG 100 mg VC/kg KG	1x	8-oxo-dG im Urin (HPLC-EC)	↔ 8-oxo-dG (50mg/kg bw), ↔ 8-oxo-dG (100mg/kg bw)	[139]
MS , n=6 Kombination aus VC und VE im Futter	15 mg VE/kg Futter + 33 mg/660 mg/13,2 g VC/kg Futter oder 660 mg VC/kg Futter + 15 mg/150 mg/1,5g /kg VE/kg Futter	35 T	8-oxo-dG in Leber (HPLC-EC)	↔ 8-oxo-dG	[138]

1 Abkürzungen: EC-Elektrochemische Detektion , HPLC- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie **M**- Maus, **MS**- Meerschweinchen, **n**= Anzahl der Tiere pro Gruppe, **R**- Ratte, **sc**- subcutan, **SCGE**-Einzelzellgelelektrophoresetest, **T**- Tage, **t-bH**- tert-butyl-Hydroperoxid, **TW**- Trinkwasser, **VE**-Vitamin E, ↑ signifikante Zunahme (p<0,05), ↔ keine Änderungen

2.4 Verfahren zur Identifikation von antioxidativ wirksamen Schutzsubstanzen in der menschlichen Nahrung

Um Nahrungsinhaltsstoffe mit antioxidativen Eigenschaften zu detektieren, werden häufig *In-vitro*-Experimente durchgeführt, in denen, meist mit spektrophotometrischen Methoden, die Inhibition von Oxidationsprozessen erfasst wird.

Eine kritische Auswertung der derzeit angewendeten Methoden zeigte, dass die derzeit eingesetzten Verfahren unzuverlässig sind [1]. Vor allem *In-vitro*-Untersuchungen mit subzellulären Fraktionen bzw. stabilen Zelllinien reflektieren die Situation im Menschen nur teilweise, da Signalfade und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (die intrazelluläre Schutzprozesse aktivieren) unter diesen Versuchsbedingungen nicht repräsentiert werden. Zusätzlich werden die Untersuchungen oft unter unphysiologischen

Bedingungen durchgeführt; auch die Verstoffwechselung in den Zellen entspricht nicht oder nur teilweise der Situation im lebenden Säugetier [141,142].

Darüber hinaus ermöglichen diese Verfahren keine Aussagen über die Wirksamkeit von Antioxidantien beim Menschen, da sie keine Informationen darüber liefern, ob die Substanzen über den Verdauungstrakt aufgenommen werden. Beispielsweise zeigte sich, dass großmolekulare Verbindungen wie Chlorophylle, Cucurmin und Anthocyane im Körperinneren keine Wirksamkeit besitzen, da sie nur in geringem Ausmaß absorbiert werden.

Um zuverlässige Aussagen über die Wirksamkeit von Antioxidantien treffen zu können, ist die Durchführung von Tierexperimenten oder Humanstudien erforderlich sowie die Verwendung aussagekräftiger Marker, die mit der Ätiologie von Krankheiten in Zusammenhang stehen. Relativ vielversprechende Endpunkte sind solche, die DNA-Schäden betreffen, da diese kausal mit Krebs und anderen Erkrankungen in Zusammenhang stehen, sowie die Messung der Oxidation anderer biologisch relevanter Moleküle, die mit neurodegenerativen Erkrankungen bzw. Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziiert sind (z.B. LDL-Oxidation).

2.5. Einzelzellgelelektrophoretetests (SCGE-Test)

2.5.1. Entwicklung

1978 wurde von Rydberg und Johanson erstmals eine neue Methode entwickelt, mit deren Hilfe es möglich war, das Verhältnis von Einzelstrang-DNA zu Doppelstrang-DNA zu messen. Dabei wurden einzelne Zellen in Agarose eingebettet und unter alkalischen Bedingungen lysiert (pH 12). Dies führte dazu, dass sich die spiralförmige Struktur der DNA auflöste und Strangbrüche entstanden. Wurde die DNA mit Acridin-Orange gefärbt, emittierten die Einzelstränge rotes, die Doppelstränge grünes Licht. Die Menge an Einzelstrang-DNA wurde durch das Verhältnis der Intensität des grünen zu jener des roten Lichts ermittelt [143].

Einige Jahre später wurde von Ostling und Johanson eine veränderte Version dieses Verfahrens entwickelt, in der statt der Alkalibehandlung eine Elektrophorese durchgeführt

wurde [144]. 1988 wurde die Methode erneut modifiziert und die Alkalibehandlung während der Elektrophorese durchgeführt [13]. Dieses Verfahren wurde die am meisten angewandte und zitierte Version des SCGE-Tests (Comet-Assay)

Eine Reihe von Vorteilen (einfache, schnelle und kostengünstige Durchführung, breites Anwendungsspektrum) führte dazu, dass die alkalische Version des SCGE-Tests heute sowohl bei *In-vitro*-Tests als auch bei Tier- und Humanstudien häufig eingesetzt wird [145]. Abbildung 11 zeigt verschiedene Anwendungsbereiche dieses Verfahrens.

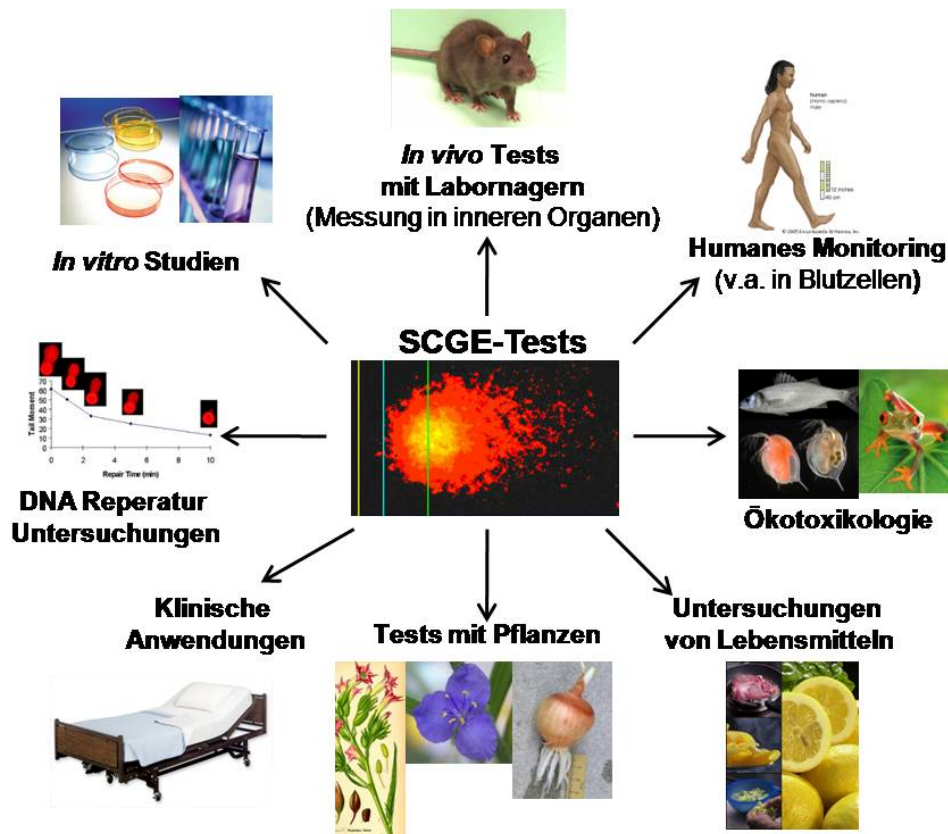


Abbildung 11: Anwendungsbereiche des Einzelzellgelelektrophoresetests

2.5.2. Endpunkte von Einzelzellgelelektrophoresetests

Das Prinzip, das dem SCGE-Test zugrunde liegt, ist die Quantifizierung der Migration der DNA in einem elektrischen Feld. Im Zellkern liegt die DNA im nuklearen Gerüst als eine spiralförmige Helix, in aufgewickelter Form vor. Behandlung mit einer Lyselösung (mit hohem Salz- und Detergentiengehalt) führt zur Entfernung der zytosomalen und nuklearen Proteine, und es bleiben kernähnliche Strukturen ohne Proteingehalt („Nukleotide“) zurück. Ihre Auftrennung im elektrischen Feld führt zu einer „Entspiralisierung“ und der

nachfolgenden Wanderung in Richtung der Anode und somit zur Entstehung von „Kometen“ [145].

Wie in internationalen Richtlinien empfohlen, wurde in der vorliegenden Arbeit die alkalische Version des SCGE-Tests eingesetzt, da unter diesen Bedingungen Doppel- und Einzelstrangbrüche sowie apurine Stellen der DNA erfasst werden können [12].

Um die Mechanismen der DNA-Schädigung genauer zu charakterisieren, wurde von Collins et al. [146] ein Protokoll entwickelt, das die Quantifizierung der endogenen Bildung oxidierter Basen ermöglicht: Nach der Lysebehandlung wurden die Nukleotide mit Enzymen, die spezifische oxidierte Basen erfassen und so zu einem Strangbruch führen, behandelt. Für diese Version des SCGE-Tests werden bestimmte Enzyme eingesetzt, nämlich Endonuclease III, das die Detektion oxidierter Pyrimidine ermöglicht, und Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase für die Messung von 8-Oxoguanine, dem Oxidationsprodukt von Purinen und diverser anderer strukturell veränderter Purine [147].

Die Auswertung der SCGE-Tests erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop. Die Kometen können durch Verwendung interkalierender Substanzen, wie beispielsweise mit Ethidiumbromid, sichtbar gemacht werden. Die Quantifizierung der genotoxischen Schäden kann entweder visuell oder mit Hilfe eines Computerprogrammes erfolgen. Eine Reihe von Parametern können erfasst werden, darunter der „Tail-Moment“, die „Tail-Länge“ und die „Tail-Intensität“ (Abbildung 12). Der letztgenannte Parameter wird derzeit am häufigsten für die Quantifizierung der Schäden verwendet [148].

$$\text{Tail-Intensität (\%)} = \frac{\text{DNA im Tail}}{\text{DNA in der Zelle}} \times 100$$

Abbildung 12: Definition und Berechnung der Tail-Intensität (modifiziert nach Burlinson et al., 2007 [148])

Die „Tail-Intensität“ wird als Prozentsatz angegeben, daher liegen die Werte in einem Bereich zwischen 0 und 100. Die Tail-Länge wird in µm angegeben und kann zwischen den einzelnen Versuchen stark variieren; dies hat den Nachteil, dass diese Messgröße, im Gegensatz zur Tail-Intensität, nicht standardisierbar ist.

Die Ergebnisse von Comet-Assays sind gewöhnlich nicht normal verteilt, es handelt sich um Anteile der Fluoreszenz innerhalb des Tails zur Gesamtfluoreszenz. Diese Anteile

können wegen der Begrenzung innerhalb von 0 und 100% nicht normalverteilt sein. Daher empfiehlt sich eine Transformation, nämlich die Arcus-Sinus-Transformation, der Daten, um eine Normalverteilung zu erhalten [149]. Anschließend können parametrische Verfahren zur Auswertung der Ergebnisse herangezogen werden.

2.5.3. Einsatz bei humanen Interventionsstudien

Seit der Erfindung des SCGE-Tests wird diese Methode zunehmend für die Untersuchung DNA-protectiver Wirkungen von Schutzsubstanzen in der menschlichen Nahrung eingesetzt, da sie einfacher und kostengünstiger durchzuführen ist als andere Methoden wie beispielsweise Chromosomenaberrationsanalysen oder Kleinkerntests [150].

Die Mehrheit der humanen Interventionsstudien wurde entsprechend dem Protokoll von Collins und seinen Mitarbeitern durchgeführt (für Übersichtsarbeiten siehe Collins et al. 2004 und Collins et al., 1997 [147,151]).

Interessante Ergebnisse wurden beispielsweise in Studien mit Kaffee erzielt, in denen die Probanden 600-1000 ml/T für 5-7 Tage konsumierten, und ein signifikant protektiver Effekt erzielt werden konnte [152,153]. Im Gegensatz dazu wurden in einer Interventionsstudie mit 600 g Gemüse oder Obst pro Tag keine positiven Effekte beobachtet. [154]. GA zeigte eine starke Wirkung in der Prävention gentoxischer Schäden [11].

2.6. Biochemische Parameter

2.6.1. Gesamte antioxidative Kapazität (TEAC)

Die Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität (TEAC) hat eine höhere biologische Aussagekraft als die Messung einzelner oxidierten Spezies, und ist von größerer Relevanz für die *In-vivo*-Balance zwischen oxidierten und antioxidativ wirksamen Molekülen als die Messungen der einzelnen Antioxidantien [155]. Die Gruppe der endogenen antioxidativ wirksamen Moleküle umfasst Bilirubin, Harnsäure, Protein-Thiole und Antioxidantien aus Nahrungsmitteln, beispielsweise die Vitamine C und E und aromatische Substanzen wie Flavonoide und Phenolsäuren [156].

Um die Gesamtheit der antioxidativen Kapazität zu erfassen, wurden verschiedene Strategien entwickelt, u.a. der „TEAC“-Assay. Dieser Parameter kann sowohl im Plasma als

auch in anderen Körperflüssigkeiten gemessen werden. Der Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure) Äquivalent (TEAC)-Assay wurde von Miller und Coauthoren 1993 [157] das erste Mal angewandt und von Re et al. [158] modifiziert, unter anderem wurde die direkte Bildung des Radikals (siehe unten), ohne Entstehung eines Zwischenprodukts, ermöglicht.

Die Messung beruht auf der Inkubation von 2,2'-Azinobis-3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure (ABTS) in der Gegenwart von Peroxidase und Wasserstoffperoxid oder Hydroxyl, Peroxy, Alkoxyl und inorganischen Radikalen, dies führt zur Bildung des $ABTS^+$ Radikals, welches spektrophotometrisch quantifiziert wird.

Werden Antioxidantien vor der Zugabe von Wasserstoffperoxid zugegeben, verhindern sie die Freisetzung des Radikals durch Wasserstoffperoxid, es kommt zur Verzögerung der Bildung des Radikalkations (siehe Abbildung 13).

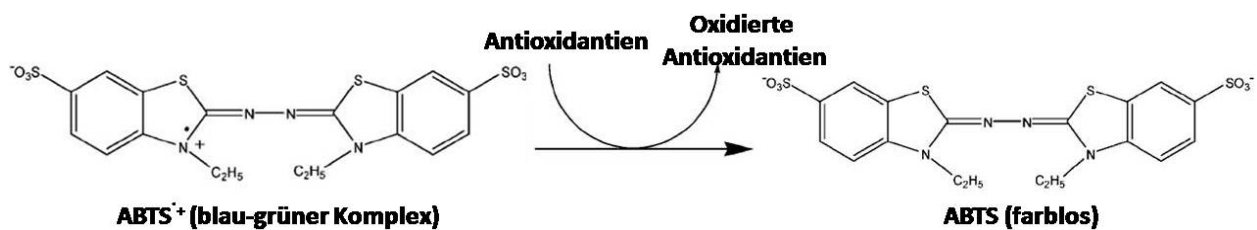


Abbildung 13: Reaktion eines Antioxidants mit dem $ABTS^+$ Radikalkation (modifiziert nach Fischer et al., 2005 [159])

Neben dem TEAC-Assay zählen der „ferric ion reducing antioxidant parameters“ (FRAP)-Test, der „oxygen radical absorbance capacity“ (ORAC)-Test und der “total radical trapping antioxidant parameters” (TRAP)-Test zu den populärsten Untersuchungsmethoden der gesamten antioxidativen Kapazität.

2.6.2. LDL-Oxidation

Die Oxidation der Lipoproteine niedriger Dichte wird in Zusammenhang mit der Auslösung von Atherosklerose gebracht [160]. Die Oxidation löst eine Modifikation von Apolipoprotein B aus, dies führt dazu, dass die LDL-Partikel von Makrophagen-Rezeptoren erkannt werden. Dadurch kann es zu einer massiven Einlagerung von oxidiertem Cholesterin und zur Entstehung von Schaumzellen kommen [161]. Oxidiertes LDL besitzt Eigenschaften,

die vom Immunsystem erkannt werden. Unter anderem kommt es zu einer chemotaktischen Reaktion von Monozyten, die sich an die innere Gefäßwand anlagern und zu Makrophagen umwandeln. Darüber hinaus kommt es zu einer Proliferation von Monozyten, endothelialen Zellen und glatten Muskelzellen, was zu einer Verengung der Arterien führt und den ersten Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose darstellt [162].

Die am häufigsten angewandte Methode, um die Empfindlichkeit von LDL-Partikeln gegenüber Oxidation zu bestimmen, ist die Messung der „Lag-Phase“ der isolierten LDL-Proteine wenn sie Oxidantien wie z.B. Kupfer ausgesetzt sind [163]. Unter der „Lag-Phase“ wird jene Zeitspanne verstanden, die zwischen der Zugabe von Oxidantien zu isolierten LDL-Proteinen und dem Beginn der LDL-Oxidation vergeht. Die Lag-Phase reflektiert die Resistenz der LDL-Proteine gegenüber Oxidation. Antioxidantien sind auf der Oberfläche der LDL-Partikel vorhanden, und Radikale beginnen zuerst mit dem „Abbau“ dieser Antioxidantien, bevor es zur Oxidation des LDL-Partikels kommt [164] .

Der in der vorliegenden Studie eingesetzte Test basiert auf der Zerstörung eines LDL-spezifischen Indikators (Fluoreszenzfarbstoff) während der Oxidation, die fluorimetrisch verfolgt werden kann. Die Zerstörung des Indikators während der Oxidation ist proportional zur oxidativen Veränderung der Proteine [160,165].

2.7. Immunologische Parameter

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf immunologisch relevante Proteine, die zur Gruppe der Zytokine zählen, bestimmt. In den folgenden Kapiteln werden der Tumor Nekrose Faktor α , Interferon γ , Interleukin 4, Interleukin 6 und Interleukin 10 näher beschrieben.

2.7.1. Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)

TNF- α ist ein multifunktionelles Zytokin, das an der Regulation zellulärer und biologischer Prozesse, wie Immunfunktionen, der Zelldifferenzierung, Proliferation, Apoptose und dem Energiehaushalt, beteiligt ist [166]. TNF- α wird vor allem von aktivierten Makrophagen, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen synthetisiert und ist ein 26 kDa

schweres Transmembran Monomer (pro-TNF- α). Dieses wird durch das TNF- α konvertierende Enzym gespalten, wodurch ein 17 kDa lösliches TNF- α -Molekül entsteht [167,168].

Die Aktivität des TNF- α hängt zum größten Teil von seinen Rezeptoren ab, nämlich dem TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2). Obwohl die Affinität für den TNFR-2, der in allen Zellen exprimiert wird, fünfmal größer ist, wird die Mehrheit der biologischen Funktionen von TNF- α von TNFR-1, welcher v.a. in Immunzellen vorkommt, kontrolliert [169]. TNFR-1 ist ein dualer Rezeptor und kann neben der Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptose) auch zur Aussendung von Signalen, welche dem Überleben der Zelle dienen, führen [170] (siehe Abbildung 14).

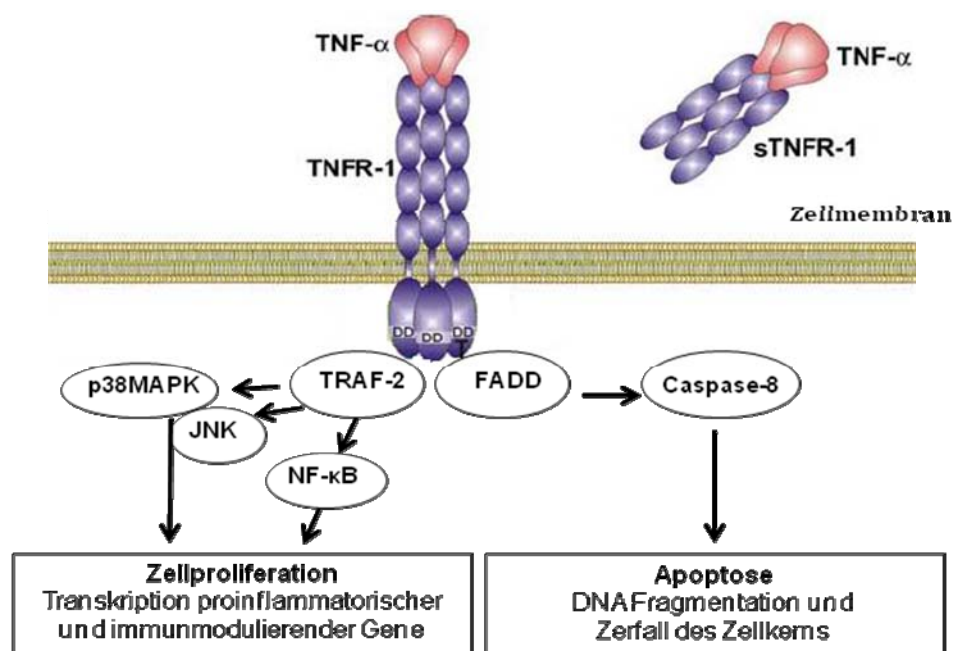


Abbildung 14: Signalpfade des Tumor Nekrose Faktor Rezeptor-1 (modifiziert nach Van Horssen et al., 2004 [170]). Nach Bindung von TNF- α an TNFR-1 kommt es zur Aktivierung des TNFR assoziierten Faktors 2 (TRAF-2) und der Fas-assoziierten „Death domain“ (FADD). FADD aktiviert Caspase-8, die über weitere Kaskaden die Apoptose auslöst. TRAF-2 initiiert mittels der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und der cJun N-terminalen Kinase (JNK) einen Signalpfad von Phosphorylierungsschritten, der zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Der wichtigste Reaktionsschritt dieser Kaskade ist die Auslösung der Transkription des nuklearen Faktors κ B (NF- κ B), der zur Transkription antiapoptotischer, proliferativer, immunmodulierender und entzündungsfördernder Gene führt.

2.7.2. Interferon γ (IFN- γ)

Die Interferone können entsprechend ihrer Rezeptorspezifität und Sequenzhomologie in zwei Klassen unterteilt werden: Zu den Typ I Interferonen zählen IFN- α , IFN- β , IFN- ω und IFN- τ . IFN- γ ist der einzige Vertreter der Typ II Zytokine. Er hat strukturell keine

Gemeinsamkeiten mit Zytokinen des Typs I, bindet an einen anderen Rezeptor und wird auch durch andere Chromosomenloci kodiert [171]. IFN- γ wird vermutlich von B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK) und Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen, gebildet [172-177]. Man geht davon aus, dass die Sekretion von IFN- γ durch NK und APC ein wichtiger Mechanismus in der frühen Abwehr von Infektionen ist, wohingegen die Bildung durch T-Lymphozyten einen Part in der adaptieren Immunantwort ausmacht [174,178].

Die Bildung von IFN- γ wird durch Zytokine (v.a. Interleukin 12 und Interleukin 18) reguliert, welche die Sekretion der Interferone mit dem angeborenen Immunsystem in Verbindung bringen [179-181].

Die Signaltransduktion durch IFN- γ erfolgt primär über den Jak-Stat Signalpfad, an dem über 50 Zytokine (darunter TNF- α), Wachstumsfaktoren und Hormone beteiligt sind und der der Regulation von Genen dient. Viele der durch IFN- γ ausgelösten Effekte resultieren in einem verstärkten Immunsystem in der Infektabwehr [171].

2.7.3. Interleukine 4, Interleukin 6 und Interleukin 10

Interleukine (IL) sind Bestandteile des adaptiven und angeborenen Immunsystems. Der Begriff „Interleukin“ bezeichnet Zytokine, die von Leukozyten produziert werden und auch auf diese Zellen einwirken [182].

Erhöhte **IL-4**-Produktion wurde in Zusammenhang mit der Entstehung von Atopien, eine exzessive IgE-Produktion in Folge von Kontakt mit Allergenen, beobachtet. Auch in Bezug auf infektiöse Krankheiten können hohe IL-4-Werte negative Auswirkungen haben [183]. Darüber hinaus inhibiert IL-4 die Produktion des TNF- α und Prostaglandin E_2 und unterdrückt die Förderung der Blutgerinnung aktivierter Monozyten, dies führt zu einer verminderten Bildung von Fibrin-Netzwerken, die charakteristisch für Entzündungen sind [184].

IL-6 wird, nach Stimulation durch TNF- α und IL-1, neben T_H2 -Zellen von Makrophagen und Stromazellen gebildet [185,186]. Hohe IL-6-Werte sind mit einer Reihe von Krankheiten assoziiert, darunter kardiovaskuläre Erkrankungen und Diabetes Typ 2. Möglicherweise spielt IL-6 eine Rolle bei der Krebsentstehung, insbesondere dem Wachstum von lymphatischen, renalen, Blasen- und colorektalen Krebszellen [185,187-190].

IL-10 wird von Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen und verschiedenen Untergruppen von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen gebildet. Es wirkt indirekt auf T-Zellen und inhibiert die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 und TNF- α und Chemokine [191]. IL-10 ist ein Hauptregulator der Immunantwort auf Infektionen mit Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen und Helminthen, indem es die exzessive Reaktion der T_H1 und CD8⁺ Zellen ausgleicht, welche anderenfalls zur Überproduktion von IFN- γ und TNF- α führt [192].

2.8. Ionisierende Strahlung

Unter der Bezeichnung „ionisierende Strahlung“ fasst man Strahlenarten zusammen, die eine Ionisation (Freisetzung von Elektronen) bewirken können, da ihre Quantenenergie gleich der oder größer als die Bindungsenergie eines Elektrons ist. Dazu zählen die elektromagnetische Strahlung (Röntgen- und Gammastrahlung) und die Teilchenstrahlung (Alpha, Beta- und Neutronenstrahlung) [193]. Gammastrahlung entsteht durch Vorgänge innerhalb des Atomkerns, beispielsweise beim Zerfall radioaktiver Atomkerne (Radionuklide) [193]. Gammastrahlung hat, im Gegensatz zur Röntgenstrahlung, eine genau definierte Energie die charakteristisch für das jeweilige ausgestrahlte Radionuklid (⁶⁰Co, ¹³⁷Cs, ¹²⁵I etc.) ist [194].

Die Auswirkung der ionisierenden Strahlung auf Moleküle hängt von der von ihnen absorbierten Strahlungsenergie ab. Sie wird als Energiedosis in der Einheit Gray (Gy) angegeben (alte Einheit: Rad) [193]. 1 Gy entspricht 1 J/kg (1 Gy = 100 rad).

Ionisierende Strahlen wandeln Atome und Moleküle in Radikale um. Es kommt zur Reaktion der Strahlung mit Wassermolekülen: Neben der Abspaltung von Elektronen kommt es auch zur Abspaltung von Wasserstoff, dadurch entstehen ROS, beispielsweise Hydroxylradikale ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OH}^\cdot + \text{H}^\cdot$). Von organischen Verbindungen kann ein Wasserstoffatom abstrahiert werden oder ein H[•] oder OH[•] an Doppelbindungen addiert werden. In weiterer Folge kommt es zur Bildung von Peroxylradikalen und zu Strangbrüchen der DNA [195] und zu Veränderungen von Membranen und Proteinen. Die Schäden in der DNA bestrahlter Zellen werden zum größten Teil wieder repariert. Die Kinetik dieser Reparaturprozesse ist hoch, innerhalb der ersten Stunde werden über 90% der Einzelstrangbrüche und der Basenschäden beseitigt [195].

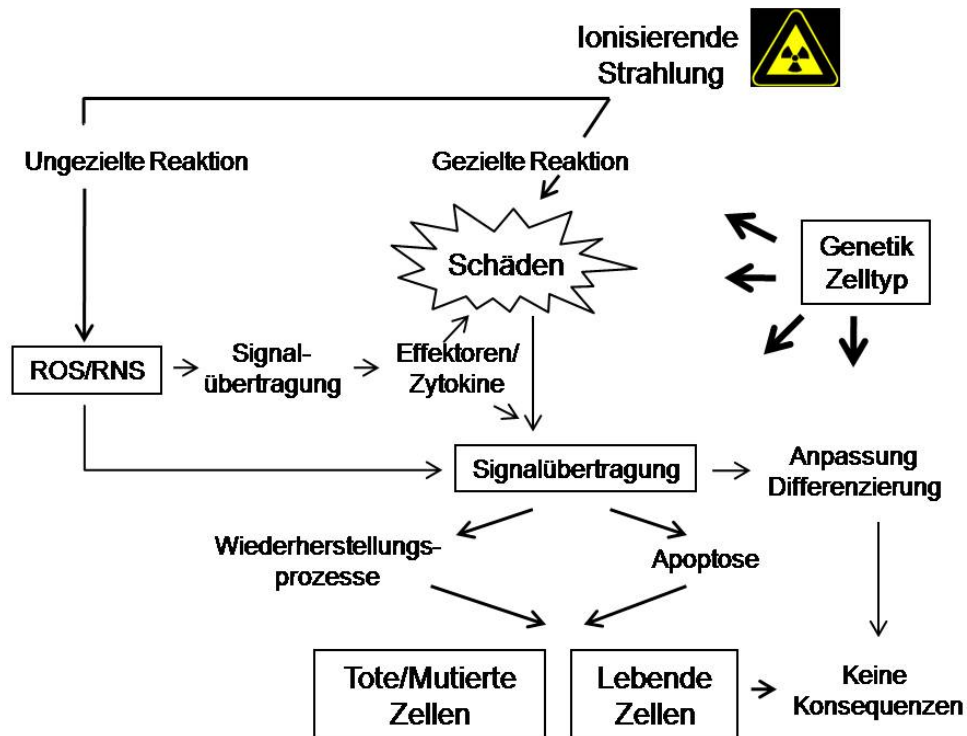


Abbildung 15: Schematischer Überblick über gezielte und ungezielte Reaktionen auf ionisierende Strahlung (modifiziert nach Wright und Coates, 2006 [196]). Ionisierende Strahlung führt, neben direkten Schäden, auch zur Entstehung von ROS und RNS. Man geht davon aus, dass die Mehrheit der biologischen Effekte der ionisierenden Strahlung durch ROS ausgelöst werden [197].

Ionisierende Strahlung führt, neben direkten Schäden, auch zur Entstehung von ROS und RNS [196] (siehe Abbildung 15), die möglicherweise die meisten biologischen Effekte der ionisierenden Strahlung auslösen [197]. Da die durch γ -Strahlung induzierten ROS zur Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen und zu oxidierten Purinen und Pyrimidinen führen, ist der Comet-Assay eine geeignete Methode, um die entstandenen DNA-Schäden zu quantifizieren [198]. Es wurde bereits eine Reihe von *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien durchgeführt, in denen die Wirkung von Antioxidantien auf die DNA-Stabilität nach γ -Strahlung untersucht wurde [107,199-202].

Der Vorteil der Induktion von oxidativem Stress mittels ionisierender Strahlung liegt darin, dass es zur Bildung von ROS im gesamten Organismus (und allen Organen kommt) und nicht, wie bei der Induktion von oxidativem Stress mittels Chemikalien (siehe Tabelle 2, Seite 18, Literaturüberblick von GTE Tierstudien), zu Schäden in spezifischen Organen.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Chemikalien

In der Tabelle 6 sind die Herkunft, die CAS-Nummer und die Verwendung der diversen Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 6: Herkunft, CAS-Nummer und Verwendung der Chemikalien¹

Chemikalien	Formel/ Abkürzung	CAS- Nummer	Verwendung	Firma
Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt	LMP Agarose	9012-36-6	Beschichtung der Objektträger	Invitrogen Life Technologies
Agarose with hohem Schmelzpunkt	NMP Agarose	9012-36-6	Auftragen der Zellen auf die Objektträger	Invitrogen Life Technologies
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol	Tris	77-86-1	Lyselösung und Neutralisationspuffer	Sigma
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-Sulfonsäure) Diammonium Salz	ABTS	30931-67-0	Bestimmung der TEAC ¹⁰	Sigma
L-Ascorbinsäure (Vitamin C)	VC	50-81-7	Testsubstanz	Sigma
Bovineserumalbumin	BSA	9048-46-8	Enzympuffer	Sigma
di-Methylsulfoxid	DMSO	67-68-5	Lyselösung	Merck
di-Natriumhydrogen-phosphat-dihydrat	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	7558-79-4	Phosphatpuffer	Merck
Endonuclease III	Endo III	-	Detektion oxidierte Pyrimidine	Slowakische Medizinische Universität
Ethidiumbromid	EtBr	1239,45,8	Färbung der Objektträger	Sigma
Ethylendiamin-Tetraessigsäure	EDTA	6381-92-6	Lyselösung, Elektrophorese- und Enzympuffer	Sigma
Formamidopyrimidinglycosylase	FPG	-	Detektion oxidierte Purine	Slowakische Medizinische Universität
Gallussäure	GA	149-91-7	Testsubstanz	Sigma
Grüntee-Extrakt Sunphenon 90M	GTE		Testsubstanz	Taiyo International
Histopaque-1077	Histopaque	-	Lymphozytenisolierung	Sigma
Hydrogenchlorid	HCl	7647-01-1	pH Kalibration	Merck
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-Carboxylsäure	Trolox	53188-07-1	Bestimmung der TEAC	Fluka

Fortsetzung Tabelle 6

Chemikalien	Formel/ Abkürzung	CAS- Nummer	Verwendung	Firma
Kaliumhexacyanoferrat (III)	$K_3(Fe(CN)_6)$	14459-95-1	Bestimmung der TEAC	Riedel-de Haen
Myoglobin		100684-32-0	Bestimmung der TEAC	Sigma
N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonacid	Hepes	7365-45-9	Enzympuffer	Sigma
Na-Heparin	Heparin	9005-49-6	Blutgewinnung	Ebewe Pharma
Kaliumchlorid	KCl	7447-40-7	Phosphatpuffer	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	KH_2PO_4	7778-77-0	Phosphatpuffer	Merck
Kaliumhydroxid	KOH	1310-58-3	Enzympuffer	Merck
RPMI 1640	RPMI	-	Zellkultur Medium	Sigma
Natriumchlorid	NaCl	7647-14-5	Phosphatpuffer, Lyselösung und Enzympuffer	Merck
Natriumhydroxid	NaOH	1310-73-2	Phosphatpuffer, Lyselösung, Elektrophorese- und Enzympuffer	Sigma
Sephadex G-15	-	11081-40-6	Säulenchromatographie	Sigma
Trypanblau	-	72-57-1	Bestimmung der Zellviabilität	Sigma
Wasserstoffperoxid	30 % H_2O_2	7722-84-1	Bestimmung der TEAC	Donauchem

1 Firmen: **Donauchem:** Wien, Österreich, **Ebewe Pharma Ges.m.b.H.:** Unterach, Österreich, **Fluka:** Buchs, Schweiz **Invitrogen Life Technologies Ltd :** Paisly, Schottland, **Merck:** Darmstadt, Deutschland, **Riedel-de Haen AG:** Seelze, Deutschland, **Sigma-Aldrich:** Steinheim, Deutschland, **Slowakische Medizinische Universität:** Department für experimentelle und angewandte Genetik, Bratislava, Slowakei, **Taiyo International, Inc.:** Minneapolis, USA

3.2. Lösungen

Für die Isolierung der Lymphozyten, Colonozyten und Hepatozyten und für die Durchführung der SCGE Tests wurden folgende Lösungen hergestellt:

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): 8,0 g NaCl, 1,15 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KCl und 0,2 g KH_2PO_4 wurden in 1,0 l Aqua bidest. gelöst und mit 1,0 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Lyselösung: 141,1 g NaCl, 37,2 g Na_2EDTA und 12,1 g Tris wurden in 1,0 l Aqua bidest. gelöst und mit 1,0 N NaOH auf pH 10,0 eingestellt. Vor der Verwendung wurden der Lösung 1% Triton X-100 und 10% DMSO zugesetzt.

Elektrophoresepuffer: 74 ml NaOH (300 mM) und 14 ml Na₂EDTA (1 mM) wurden mit Aqua bidest. auf 2,7 l aufgefüllt (pH>13,0).

Neutralisationspuffer: 48,5 g Tris wurden in 1,0 l Aqua bidest. gelöst und mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Enzympuffer: 7,45 g KCl, 9,52 g Hepes, 0,5 g Na₂EDTA und 0,2 mg BSA wurden in 1,0 l Aqua bidest. gelöst und mit KOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Der Enzympuffer wurde jeweils am Vortag des Versuches frisch zubereitet

Hank's Salzpuffer (HBSS): 8,0 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,06 g Na₂HPO₄ und K₂HPO₄, 0,35g NaHCO₃ und 4 g Hepes wurden in 1,0 l Aqua bidest. gelöst und mit NaOH ein pH-Wert von 7,0 eingestellt.

Homogenisationspuffer: 4,38 g NaCl und 8,93 g Na₂EDTA wurden in 1,0 l Aqua bidest. gelöst und mit NaOH ein pH-Wert von 7,5 eingestellt.

3.3. Durchführung der Studie

Die Tierversuche wurden von der Ethik-Kommission der Medizinischen Universität Wien bewilligt.

3.3.1. Versuchstiere

Alle Experimente wurden mit 5 Wochen alten männlichen Him-OFA Ratten (Körpergewicht 250 ± 10 g) durchgeführt, die von der Zuchtstätte der Medizinischen Universität Wien in Himberg (Österreich) bezogen wurden. Die Tiere wurden eine Woche akklimatisiert. Sie waren in Plastikkäfigen (Macrolon Typ III, Techniplast GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland) unter Standard-Bedingungen ($24 \pm 1^\circ$ C, Luftfeuchtigkeit $50 \pm 5\%$, 12 h Tag/Nacht Zyklus) untergebracht und erhielten Standard-Futter (R/M-H, Ssniff, Soest, Deutschland).

3.3.2. Behandlung der Versuchstiere

In der vorliegenden Studie wurden humanrelevante Dosierungen von drei ausgewählten Antioxidantien, nämlich von Gallussäure (GA), Vitamin C (VC) und Grüntee-Extrakt (GTE), vergleichend untersucht. Darüber hinaus wurde eine Kombination der einzelnen Antioxidantien getestet, um mögliche synergistische Wirkungen zu erfassen.

In den Versuchen wurden die Substanzen zunächst unbestrahlten Tieren verabreicht, nachfolgend wurden Experimente durchgeführt, in denen die Ratten nach Verabreichung der Antioxidantien einer Ganzkörperbestrahlung ausgesetzt wurden. Die Messungen wurden mit drei Zellarten, nämlich mit Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten, durchgeführt. Abbildung 16 zeigt schematisch die Behandlung der Tiere und die durchgeführten Messungen.

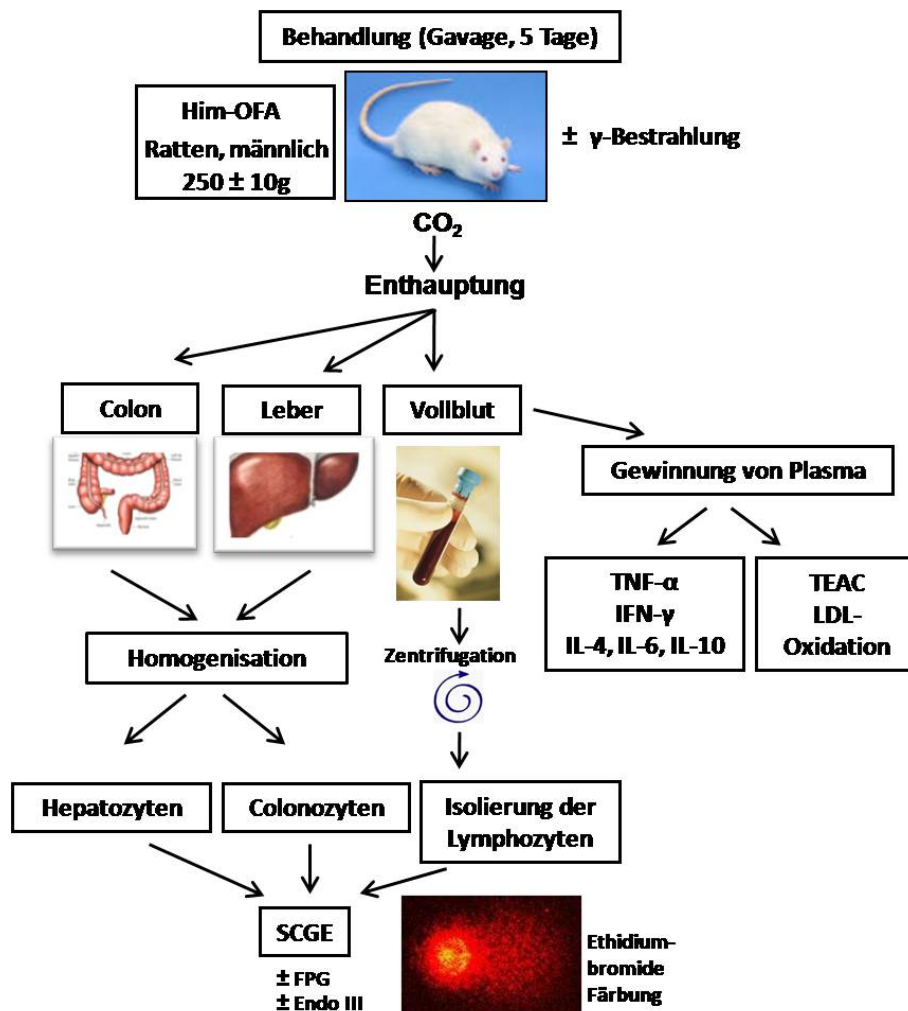


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Durchführung der Studie. Die Testsubstanzen wurden männlichen Him-OFA Ratten für 5 Tage mittels Schlundsonde verabreicht. Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere getötet, das Plasma gesammelt und die Hepatozyten, Lymphozyten und Colonozyten gewonnen. Die DNA-Migration wurden anschließend in SCGE-Experimenten (Comet-Assay) bestimmt, in den Plasmaproben wurden die biochemischen (TEAC und LDL-Oxidation) und immunologischen Parameter (TNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-6 und IL-10) bestimmt.

3.3.2.1. Experimente mit unbestrahlten Tieren

Im ersten Teil der Studie wurden GA und jeweils zwei Konzentrationen von GTE und VC (Ascorbinsäure) getestet. Zusätzlich wurden Untersuchungen mit einer Kombination der drei Antioxidantien durchgeführt. In Tabelle 7 sind die verabreichten Mengen sowie die humanrelevanten Dosierungen aufgelistet.

Tabelle 7: Dosierung der Antioxidantien, die im ersten Teil der Studie getestet wurden

Antioxidantien	Dosierung im Tierversuch (mg per kg KG/T) ¹	Dosierung im Menschen ²	Equivalent ³
Grüntee-Extrakt	1.33 mg	100 mg	1 Tasse Grüntee
	6,65 mg	500 mg	5 Tassen Grüntee
Gallussäure	0.20 mg	15 mg	ADI
Vitamin C	1,33 mg	100 mg	DACH
	6.65 mg	500 mg	5 x DACH
Gemisch	0.20 mg Gallussäure	15 mg	ADI
	6.65 mg Vitamin C	500 mg	5 x DACH
	1.33 mg Grüntee-Extrakt	100 mg	1 Tasse Grüntee

¹ Dosierungen im Tierversuch (mg) sind im Folgenden auf eine Kommastelle gerundet ² Gesamtdosis für eine Person (Annahme: 75kg) ³ADI – Acceptable Daily Intake (WHO) [203], DACH – Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr [109], 1 Tasse = ca. 150 ml.

Die Lösungen der Testsubstanzen wurden täglich frisch zubereitet. Die Antioxidantien wurden in Leitungswasser gelöst und 0,5% kg KG/T wurden den Tieren mittels Schlundsonde über einen Zeitraum von fünf Tagen verabreicht. Pro Interventionsgruppe und Zeitpunkt wurden entsprechend den Richtlinien von Hartmann et al. [204] 5 Tiere verwendet. Darüber hinaus wurde eine Kontrollgruppe (Verabreichung von Wasser mittels Schlundsonde) mitgeführt (ebenfalls fünf Tiere).

Im Anschluss an den ersten Teil der Studie, in dem unbestrahlte Tiere verwendet wurden, wurden **zusätzliche Experimente** durchgeführt. In diesen wurden weitere Kombinationen der drei Antioxidantien, nämlich ein Gemisch aus GA (0,2 mg/kg KG/T) und VC (6,7 mg/kg KG/T) und eine Kombination aus GTE (1,3 mg/kg KG/T) und GA (0,2 mg/kg KG/T) den Labornagern über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels Schlundsonde verabreicht.

3.3.2.2. Experimente mit bestrahlten Tieren

Im zweiten Teil der Studie wurden die Tiere mit GA (0,2 mg/kg KG/T) und einer Kombination aller drei Antioxidantien (1,3mg GTE/kg KG/T, 0,2 mg GA/kg KG/T und 6,7 mg VC/kg KG/T) behandelt. Nach fünftägiger Behandlung wurden die Tiere in einer ^{60}Co -Quelle bestrahlt (gesamte Dosis: 30 Gy). Der Versuchsablauf des zweiten Teils der Studie ist in Abbildung 17 dargestellt.

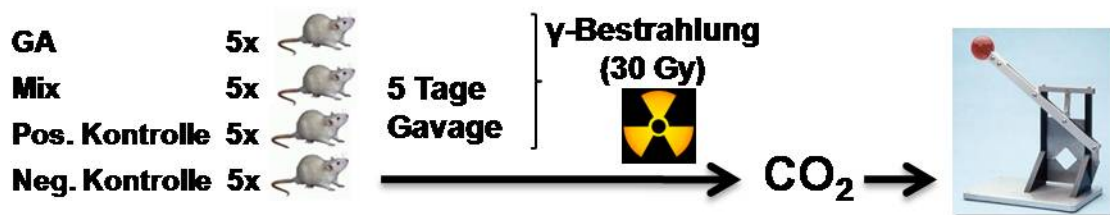


Abbildung 17: Versuchsablauf der Experimente mit bestrahlten Tieren. Jeweils fünf Tieren pro Gruppe wurde entweder Gallussäure (0,2 mg/kg KG/T) oder ein Gemisch von Antioxidantien (GA 0,2 mg/kg KG/T, VC 6,7 mg/kg KG/T und GTE 1,3 mg/kg KG/T) über einen Zeitraum von 5 Tagen mittels Schlundsonde verabreicht. Zusätzlich wurden eine positive und eine negative Kontrollgruppe (Leitungswasser mittels Schlundsonde) mitgeführt. Nach der Behandlung wurden die Tiere in einer ^{60}Co -Quelle bestrahlt. Nachfolgend wurden die Tiere nach Betäubung mit CO_2 durch Dekapitation getötet, das Blut gesammelt und die Organe (Leber und Dickdarm) entnommen.

Die Bestrahlung wurde am Institut für Ernährungswissenschaften (Sektion Strahlenbiologie) durchgeführt. Die Ratten wurden in ein Aluminiumgefäß gesetzt (Abbildung 18) und in die Bestrahlungsquelle eingebracht.



Abbildung 18: Him-OFA Ratte in Aluminiumgefäß kurz vor der Bestrahlung

Vor Beginn der Experimente wurde die optimale Strahlendosis für die Erfassung präventiver Wirkungen der Testsubstanzen ermittelt. Es wurden vier verschiedene Strahlendosen getestet, nämlich 7.7 Gy, 15.3 Gy, 22.0 Gy und 30.0 Gy.

3.4. Isolierung der Lymphozyten, Gewinnung des Plasmas

Nach der Enthauptung wurde das Blut der Tiere mit einem mit Heparin beschichteten Trichter aufgefangen und in Lithium-Heparinröhrchen (Becton Dickinson, Plymouth, UK) gesammelt. Anschließend wurde das Plasma durch Zentrifugation (Sigma Tischkühlzentrifuge 4 K 15, Osterode, Deutschland; 700 x g, 16°C, 10 min) aliquotiert und in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei -80°C tiefgefroren.

Die Isolierung der Lymphozyten wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt: In ein 15 ml AccuspinTM-Röhrchen (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) wurden 3,0 ml Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gefüllt und kurz zentrifugiert (800 x g, 16°C, 1 min). Das Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit RPMI 1640 gemischt und auf die Trennmembran (poröse Polyethylenmembran) im AccuspinTM-Röhrchen aufgebracht und 15min (800 x g, 18° C, Bremsung 0) zentrifugiert. Bei diesem Schritt (Abbildung 19) werden Erythrozyten und Granulozyten durch Polysaccharose aggregiert und sedimentieren, während Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen an der Plasma-Histopaque Grenzfläche haften.

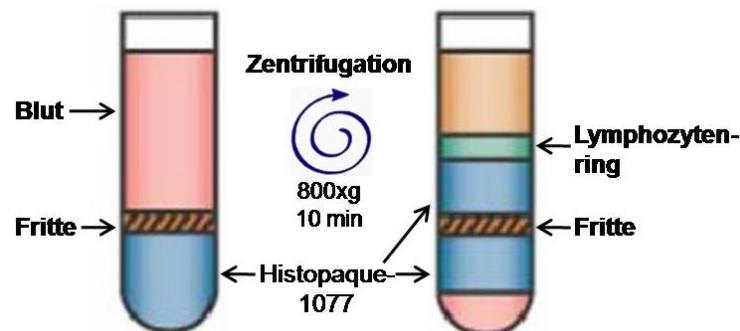


Abbildung 19: Gewinnung der Lymphozyten durch Zentrifugation (modifiziert nach Sigma-Aldrich [205])

Nach der Zentrifugation wurde der Lymphozytenring vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein Falconröhrchen (15 ml, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland), in dem bereits 5 mL RPMI enthalten waren, transferiert. Nach zwei weiteren Waschschritten (jeweils 300 x g, 18°C, 10 min), wurden die Zellpellets in 1,0 mL PBS resuspendiert.

Nach Prüfung der Zellvitalität (>80 %) mittels Trypan-Blau-Färbung (Mischverhältnis 1:1 [206]) wurden die Lymphozyten direkt für die Durchführung der Comet-Assays verwendet.

3.5. Isolierung der Hepatozyten und Colonozyten

Unmittelbar nach Tötung der Ratten wurde ca. 1,0 g des rechten **Leberlappens** entnommen, in 4,0 mL gekühlten Homogenisationspuffer (pH 7,5) transferiert und bei 400 rpm auf Eis homogenisiert (Typ Potter-Elvehjem, B. Braun, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurde das Homogenat bei 800 x g und 4°C 10 min zentrifugiert [207], der Überstand in LMA eingebettet, auf die vorbeschichteten Objektträger aufgetragen und der Comet-Assay durchgeführt.

Die **Colonozyten** wurden durch Abschaben der Darmschleimhaut mit einer Edelstahl Doppelspatel (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gewonnen. Nachfolgend wurden die gewonnenen Zellen in 2,0 mL Homogenisationspuffer transferiert [207] und für den Comet-Assay verwendet.

3.6. Durchführung der Einzelzellgelelektrophoresetests

Die Durchführung der Tests erfolgte entsprechend internationalen Richtlinien [12,148,204]. Im Rahmen der Studie wurden zwei Varianten durchgeführt, nämlich der Standard SCGE-Test (nach Lyse der Zellen erfolgt die Elektrophorese) und die Detektion oxidierter Basen mit den läsionsspezifischen Enzymen Endonuklease III (Endo III) und Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (FPG). Pro Versuchstier wurden 3 Objektträger hergestellt und pro Messpunkt die Tail-Intensitäten in insgesamt 150 Zellen (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. in 100 Nuklei der Dickdarmzellen ausgewertet. Abbildung 20 (nächste Seite) gibt einen Überblick über den Ablauf des Comet-Assays.

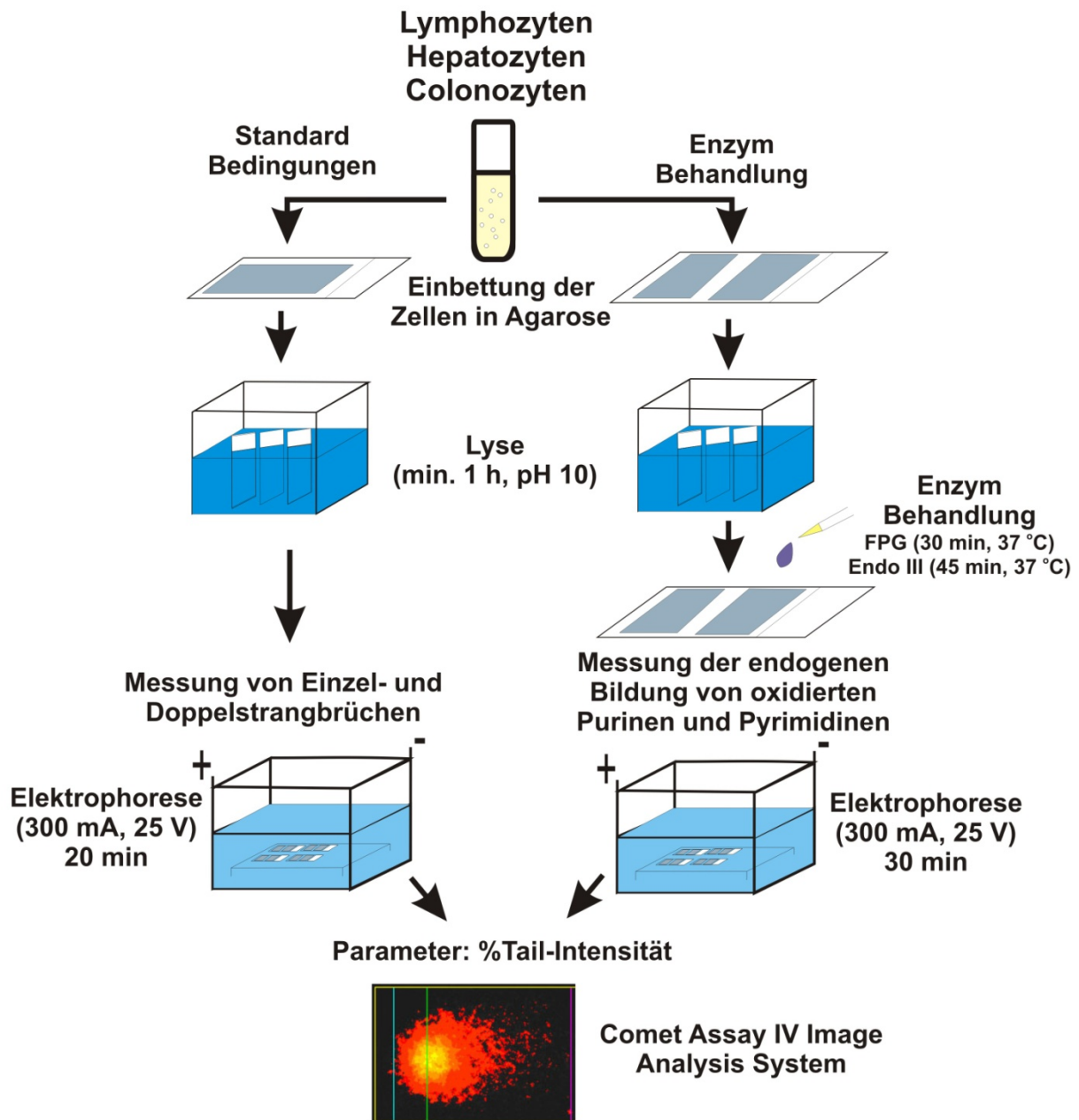


Abbildung 20: Durchführung der Einzelzellgelelektrophoresetests. Die Zellen wurden auf Objektträger aufgebracht und mit Lyse-Lösung behandelt. Unter Standard-Bedingungen wurden die Nuklei einer 20-minütigen Alkalibehandlung und einer ebenso langen Elektrophorese (300 mA, 25 V) ausgesetzt. Zusätzlich wurden Enzymbehandlung mit Endo III (45 min Inkubation, 37°C, Verdünnung 1:9000) und FPG (30 min Inkubation, 37°C, Verdünnung 1:1000) durchgeführt. Die Alkalibehandlung dauerte 40 min, die Elektrophorese 30 min (300 mA, 25 V). Nach der Elektrophorese wurden alle Objektträger mit einer Neutralisationslösung behandelt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die % Tail-Intensitäten der Cometen mit Hilfe eines computergestützten Auswertesystems mikroskopisch bestimmt.

3.6.1. Herstellung der Objektträger und Lyse

Die jeweiligen Zellsuspensionen (Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten) wurden in 80 µL LMP Agarose (37°C, 0,5% in PBS) aufgenommen, auf einen bereits mit NMP Agarose (1,5 % in PBS) beschichteten Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas bedeckt. Es wurden jeweils 20.000 Lymphozyten auf die Objektträger, die später mit den läsionsspezifischen Enzymen behandelt wurden, und 50.000 Lymphozyten auf die Objektträger, die den Standard-SCGE-Tests unterzogen wurden, aufgetragen. Nach ca. 5 min (die Objektträger waren auf Eis gelegt) wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger in mit Lyse gefüllten Behältern (4°C) für mindestens 1 h im Dunkeln gelagert. Der Lyselösung wurde unmittelbar vor Verwendung Triton X-100 (1 mL auf 100 mL Lyse) zugefügt. Alle nachfolgenden Schritte wurden ebenfalls in Dunkelheit (unter Rotlicht) durchgeführt, um zusätzliche DNA-Strangbrüche zu vermeiden.

3.6.2. SCGE-Test unter Standard-Bedingungen

Unter Standard-Bedingungen wurden die Objektträger direkt nach der Lyse in eine Horizontalelektrophoresekammer (26 cm x 40 cm, C.B.S. Scientific Co., Californien, USA) in kalten Elektrophoresepuffer (4°C, pH>12) gelegt. Nach Alkalibehandlung (20 min, pH>12), die erforderlich ist, um doppelsträngige DNA in Einzelstränge überzuführen, wurde für 20 min Spannung angelegt (300 mA und 25 V) (Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen, Deutschland).

Die Objektträger wurden nach Ende der Elektrophorese 2 x 8 min mit kaltem Neutralisationspuffer (pH 7,5, 4°C) gewaschen, anschließend mit Aqua bidest. gespült und über Nacht an der Luft getrocknet.

3.6.3. SCGE-Test mit läsionsspezifischen Enzymen

Um die Bildung endogen oxidierter Purine und Pyrimidine zu bestimmen, wurden Versuche mit läsionsspezifischen Enzymen, wie von Collins et al. [147] beschrieben, durchgeführt. Vor der Durchführung der Hauptexperimente wurde die Wirksamkeit der Enzyme durch entsprechende Kalibrationsexperimente sichergestellt.

Nach der Lyse wurden die Objektträger zweimal jeweils 8 min in Enzympuffer (pH 7,4, 4° C) gelegt und gespült. Danach wurden 50 µL der verdünnten Enzyme (Endo III 1:9000 bzw. 1:1000, FPG 1:1000) bzw. 50 µL des Enzympuffers auf die Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas bedeckt, anschließend folgte eine Inkubation für 45 min (Endo III) bzw. 30 min (FPG) bei 37° C.

Nach Entfernung der Deckgläser wurden die Objektträger in eine Horizontalelektrophoresekammer gelegt (26 cm x 40 cm, C.B.S. Scientific Co., Californien, USA) und nach der Alkalibehandlung (40 min) die Elektrophorese (30 min, 300 mA, 25 V) durchgeführt (Standard Power Pack P25, Biometra, Göttingen, Deutschland).

Die Objektträger wurden nach Ende der Elektrophorese 2 x 8 min mit kaltem Neutralisationspuffer (pH 7,5, 4° C) gewaschen, anschließend mit Aqua bidest. gespült und über Nacht an der Luft getrocknet.

3.6.5. Auswertung und Statistik

Nach Trocknung der Objektträger wurde Ethidiumbromid auf die Objektträger aufgetragen (20 µL). Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon EFD-3, 25:1 Objektiv). Entsprechend den internationalen Richtlinien für *in vivo* Comet Assay [12] wurden pro Tier und Organ drei Objektträger hergestellt und 150 (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. 100 Zellen (Colonozyten) ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mit einem computer-gestützten Auswerteprogramm (Comet Assay IV, Perceptive Instruments, UK) (Abb 21.). Als Parameter der DNA-Wanderung wurden die Tail-Intensitäten (in %) erfasst.

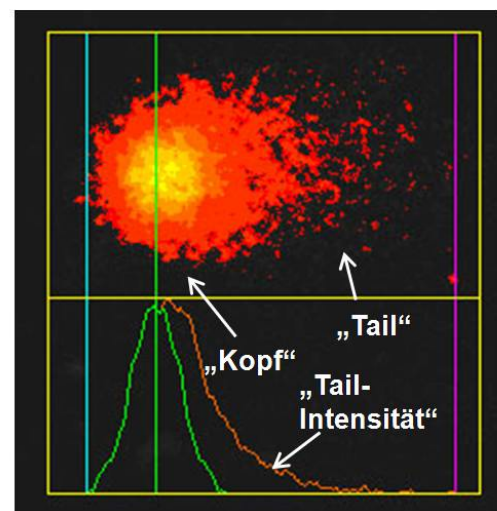


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Auswertung eines Kometen mit Comet Assay IV

Pro Tier wurden 3 (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. 2 Mediane (Colonozyten) berechnet und im Anschluss aus diesen 3 bzw. 2 Werten ein Mittelwert pro Tier bestimmt. Um die Differenzen (Δ %) der Tail-Intensität zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und der Interventionsgruppen zu eruieren, wurden die Mediane der Mittelwerte der 5 Tiere jeder Gruppe kalkuliert.

Für die statistische Hypothesenprüfung wurden die Mediane der Tail-Intensitäten „Arcus-Sinus“ transformiert, um Homogenität der Varianzen zu erreichen (neben der auf Seite 28 dargestellten Problematik der Begrenzung der Messgrößen im Intervall 0-100% neigen die Messgröße der % Tail-Intensität dazu, bei höheren Werten auch eine größere Varianz der Daten aufzuweisen, diese Korrelation wird mit Hilfe der Transformation aufgehoben). Durch Anwendung des Dixon-Tests wurden Ausreißer eliminiert. Die Mittelwerte der drei (oder zwei, falls ein Ausreißer entfernt wurde) Mediane jeder Behandlung wurden berechnet und diese Werte erneut mit dem Dixon-Test analysiert. Die Analyse der Varianzen wurde durch Anwendung eines gemischten Modells mit den Versuchstieren als stochastischer Faktor und Versuchsbedingungen (Kontrolle, GTE, GA, VC, Kombinationen) als fixer Faktor zwischen den einzelnen Tieren durchgeführt. Vergleiche der Gruppen (Kontrolle mit den Interventionsgruppen) wurden durch lineare Kontraste ermittelt. Effekte und Kontraste wurden als signifikant angenommen, wenn der p-Wert unter 0,05 lag. Die Homogenität der Varianzen wurde mittels Levene-Test bestimmt. Residuen wurden durch Anwendung des Lilliefors-Tests auf Normalverteilung getestet. Für diesen Test wurde ein Signifikanzniveau von 0,01 festgelegt.

3.7. Messung der biochemischen Parameter

3.7.1. Gesamte antioxidative Kapazität (TEAC)

3.7.1.2. Verwendete Lösungen

Für die Trolox-Lösung (2,5 mM) wurden 156,4 mg Trolox in 250 ml PBS gelöst. Die verschiedenen Konzentrationen der Lösung (0,5; 1,0; 1,5 und 2 mM) wurden direkt vor der Messung frisch hergestellt.

Die H₂O₂-Stocklösung wurde durch Verdünnung von 515 µl 30% H₂O₂ mit 10 ml PBS hergestellt (Konzentration: 500 mM). Die bei den Messungen verwendete Lösung (450 µM) wurde erhalten, indem 45 µl der Stocklösung mit 50 ml PBS versetzt wurden. Sowohl die Stock- als auch die später eingesetzte Lösung wurden am Tag der Messungen frisch hergestellt.

Um die ABTS-Lösung herzustellen, wurden 27,4 mg ABTS in 10 ml PBS gelöst. Diese Lösung weist einen Extinktionskoeffizienten von 18,8 bei 340 nm auf.

Metmyoglobin wurde vor der Verwendung auf einer 35 x 2,5 cm Pharmacia XK26 Säule (mit 50 g Sephadex G-15 gefüllt) in PBS aufbereitet. 10 ml Myoglobin (400 µM, 75,2 mg in 10 mL PBS = Lösung 1) wurde einer 10 ml Eisencyanidlösung (24,4 mg Kaliumhexacyanoferrat in 100 mL PBS = Lösung 2) zugegeben. Dieses Gemisch wurde auf die Trennsäule aufgebracht und mit PBS eluiert. Die Fraktionen wurden in 5 min Abstand gesammelt und die Absorption jeder Fraktion bei 490, 560, 580 und 700 nm gemessen. Die bei 700 nm abgelesenen Werte wurden von jener, die bei 490, 560 und 580 nm gemessen wurden, subtrahiert, um das „Hintergrundrauschen“ zu kompensieren. Die aufbereiteten Myoglobinfaktionen wurden danach gemischt (Konzentration: 140 µM), aliquotiert und bis zur Verwendung tiefgefroren.

3.7.1.3. Durchführung der Messungen

Vor Beginn der Messungen der TEAC wurden die ABTS-Lösung und der PBS-Puffer bei 30°C (im Wasserbad) temperiert. Die Reagenzien wurden folgendermaßen gemischt:

400 µL PBS (410 µL für den Leerwert)
10 µL Trolox (bzw. 20 µL Plasmaprobe)
400 µL ABTS
20 µL Metmyoglobinlösung

Zum Starten der Reaktion wurden 170 µL H₂O₂ (450 µM) zugefügt, die Röhrchen sorgfältig gemischt und in die Küvette des Photometers (Perkin Elmer UV/VIS Spectropheter Lambda-2) transferiert. Durch Zugabe des Wasserstoffperoxids zur ABTS Lösung kommt es zur Bildung des grün-bläulich gefärbten ABTS⁺ Radikalkations. Die Absorption der Plasmaproben (734 nm) wurde nach 6 min abgelesen; die Temperatur muss während der gesamten Reaktionszeit konstant auf 30° C gehalten werden. Auf diese Weise wurde die Absorption eines Leerwerts (ohne Trolox), der Standards (Trolox in verschiedenen Konzentrationen) und der Plasmaproben ermittelt.

Um das Endergebnis zu berechnen, wurde die Absorption der Plasmaproben von der Absorption des Leerwertes abgezogen.

$$(\text{Leerwert}_{\text{Abs.}} - \text{Standard}_{\text{Abs.}}) / \text{Leewert}_{\text{Abs.}} = \%$$

Die Prozentwerte der Standards wurden anhand ihrer Konzentration mit linearen Regressionsanalysen berechnet. Der Korrelationskoeffizient war größer immer als 0,98.

3.7.2. LDL-Oxidation

Die LDL-Oxidation wurde mit einem Testkit fluorimetrisch bestimmt (Lipid-Ox, Fluoreszenz-Testsystem, Dr. Franz Tatzberg KEG, 3400 Klosterneuburg, Österreich). Dieser Test basiert auf der Zerstörung eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes (der als Indikator dient) während der Oxidation von LDL.

In einer ersten Inkubation wurde die Plasmaprobe mit dem Indikator versetzt und dadurch das LDL in der Probe markiert. Die Oxidation wurde durch einen Radikalstarter gestartet und mittels fluorimetrischer Messung (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland) ermittelt. Die Zerstörung des Indikators ist ein Maß für die Oxidation der LDL. Das Messergebnis wird als lag-Phase (in Minuten) angegeben.

3.7.3. Statistische Auswertung

Die Trolox-Equivalent- und die lag-Phase-Werte der Plasmaproben wurden jeweils in Zweifachbestimmungen ermittelt und der Mittelwert der Doppelbestimmungen ging in die statistische Auswertung ein. Für die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen wurde eine einfach Varianzanalyse mit SPSS 15.0 Windows (SPSS Inc., Chigaco, IL; Signifikanzniveau war 95%; $p < 0,05$) durchgeführt.

3.8. Messung der immunologischen Parameter

3.8.1. Tumor Nekrose Faktor α

Der TNF- α im Rattenplasma wurde mit einem ELISA-Testkit bestimmt (BD OptEIA, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Kanada). Die Auswertung erfolgte auf einem

Mikroplatten-Reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland) mit der dazugehörigen Software.

3.8.2. Interferon γ

Die IFN- γ -Werte im Plasma der Ratten wurden mit einem ELISA Testkit (BD OptEIA, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Kanada) ermittelt. Die Auswertung erfolgte auf einem Mikroplatten-Reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland) mit der dazugehörigen Software.

3.8.3. Interleukin 4, Interleukin 6 und Interleukin 10

IL-4, -6 und -10 wurden, wie die übrigen immunologischen Parameter, mit ELISA Testkits bestimmt (BD OptEIA, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Kanada). Die Auswertung erfolgte auf einem Mikroplatten-Reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Deutschland) mit der dazugehörigen Software.

3.8.4. Statistische Auswertung

Die TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 und IL-10-Werte der Plasmaproben wurden jeweils in Zweifachbestimmungen ermittelt und der Mittelwert der Doppelbestimmungen ging in die statistische Auswertung ein. Für die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen wurde eine einfache Varianzanalyse mit SPSS 15.0 Windows (SPSS Inc., Chicago, IL; Signifikanzniveau war 95%; $p < 0,05$) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Dieses Kapitel besteht aus zwei Teilen. Im ersten werden die Ergebnisse der SCGE-Experimente und der biochemischen und immunologischen Parameter der Studie, die mit unbestrahlten Tieren erhalten wurden, vorgestellt. Zusätzlich enthält dieses Kapitel Resultate der ergänzenden Experimente. Der zweite Teil betrifft jene Ergebnisse, die mit bestrahlten Tieren erzielt werden konnten. Die Resultate zeigen jeweils gentoxische Parameter (SCGE-Tests), biochemische (TEAC und LDL-Oxidation) und immuno-logische Parameter (TNF- α , IFN- γ und Interleukine).

4.1 Experimente mit unbestrahlten Tieren

4.1.1 Einzelzellgelelektrophoresestests

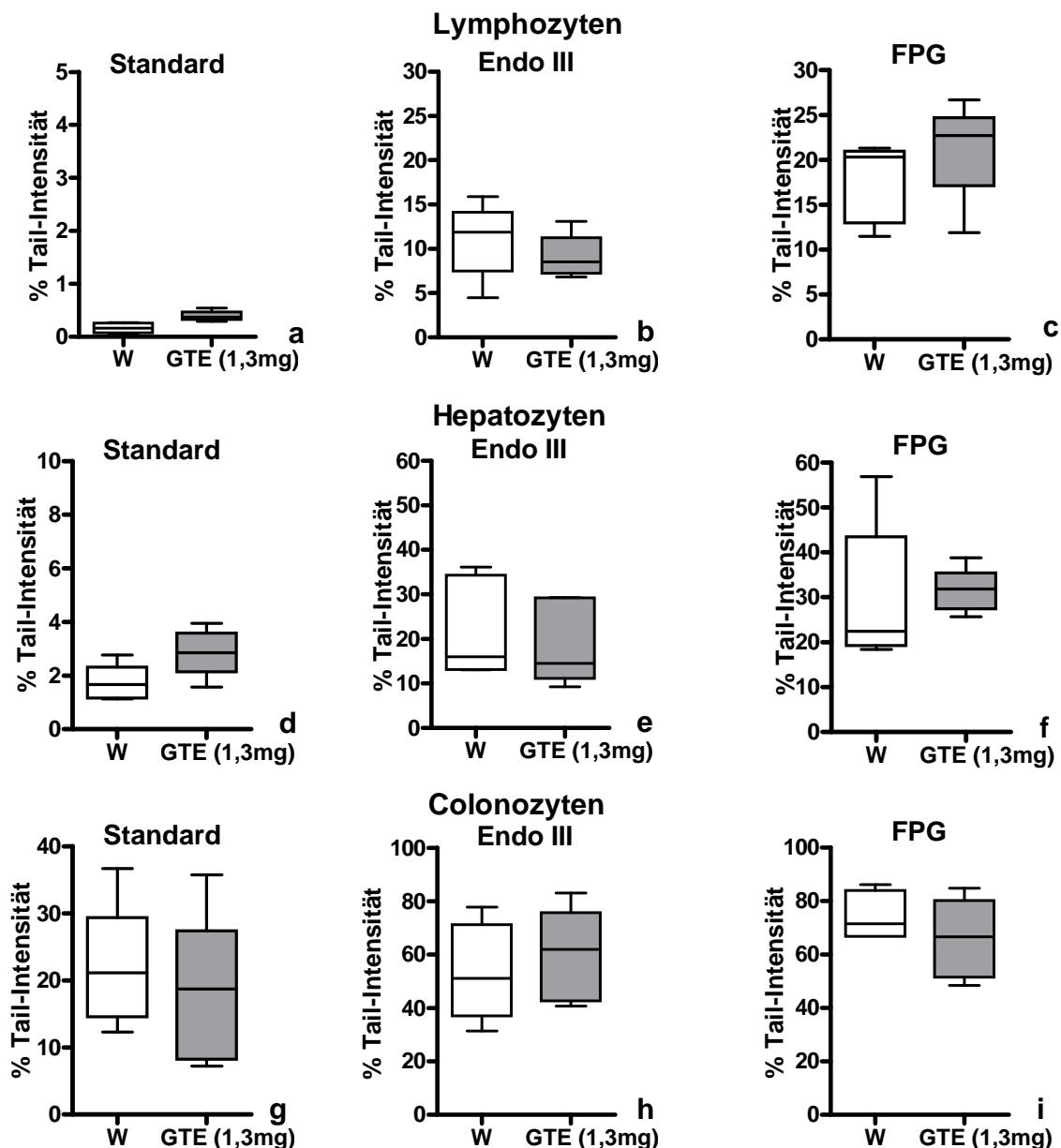
Die Resultate, die mit Grüntee-Extrakt, Gallussäure, Vitamin C und einer Kombination dieser drei Substanzen mit SCGE-Tests erzielt wurden, sind in den nachfolgenden Abschnitten (4.1.1.1. bis 4.1.1.5.) beschrieben.

In den Kalibrationsexperimenten wurde eine optimale Wirksamkeit der Enzyme bei einer Verdünnung von 1:1000 (FPG) und 1:9000 (Endo III) gefunden. Bei Behandlung der Nuklei mit den läsionsspezifischen Enzymen (Endo III und FPG) konnte in allen untersuchten Organen (Blut, Leber und Colon) eine Erhöhung der DNA-Migration gegenüber der Behandlung mit der Enzympufferlösung festgestellt werden. In Lymphozyten wurde mit FPG eine 5-fache Erhöhung und mit Endo III eine Verdopplung der DNA-Schäden detektiert. In Hepatozyten wurde mit FPG ein Anstieg der DNA-Migration um ca. das 4-fache bzw. mit Endo III um das Doppelte gefunden, in den Colonozyten kam es aufgrund der bereits hohen Ausgangswerte jeweils zu einer Zunahme der Tail-DNA um das 1,5-fache (FPG und Endo III).

4.1.1.1 Grüntee-Extrakt

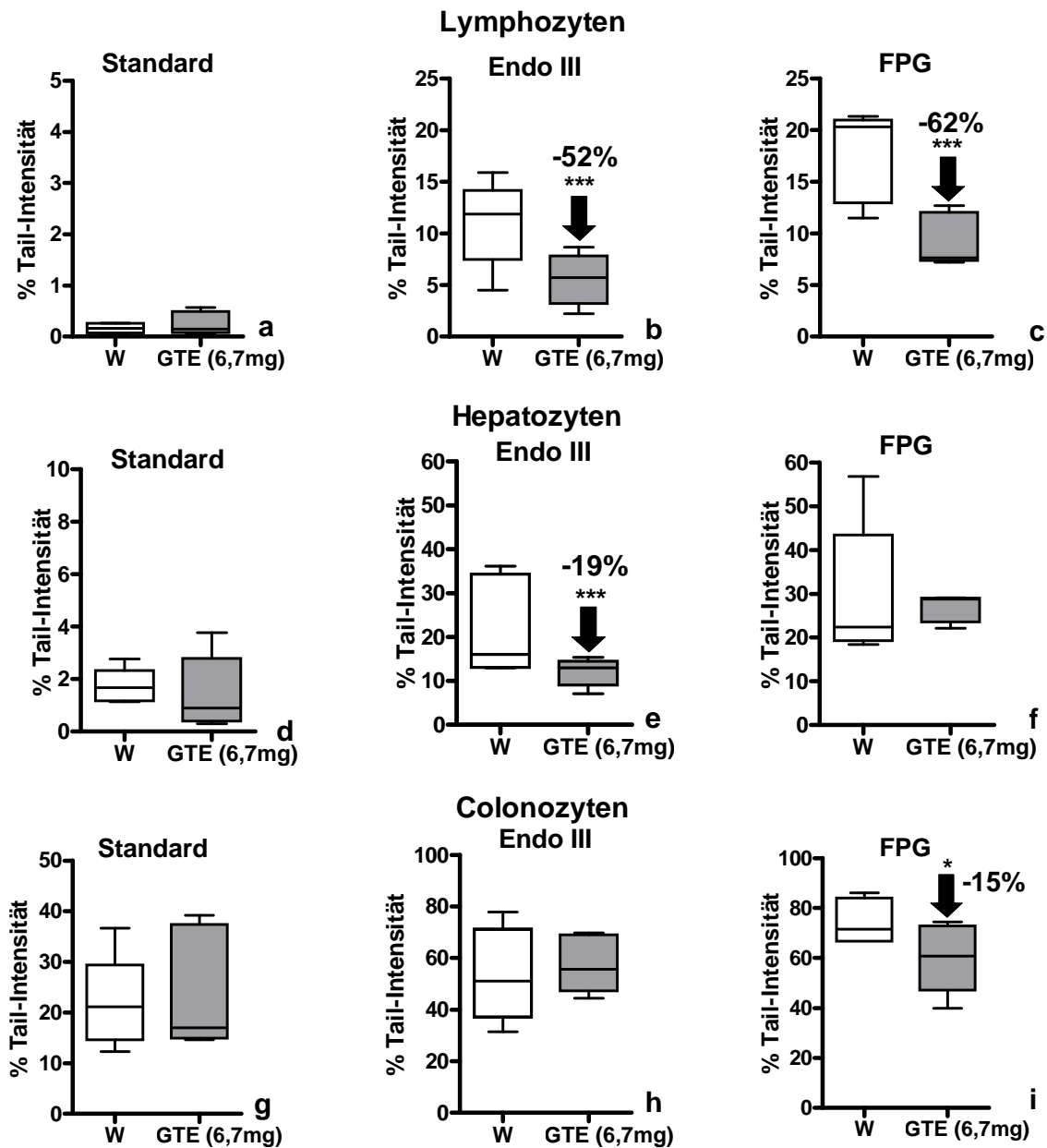
Die Ergebnisse, die mit GTE mit einer Dosis von 1,3 mg/kg KG pro Tag erzielt werden konnten (dies entspricht dem Konsum von 1 Tasse Grüntee beim Menschen), sind in den Abbildung 22 a-i dargestellt. Es wurden unter keiner Testbedingung (Standard, Endo III und

FPG) protektive Wirkungen des GTE detektiert. Im Gegensatz dazu wurde in einigen Fällen (z.B. in Lymphozyten und Hepatozyten nach FPG Behandlung) eine geringfügige (nicht signifikante) Zunahme der DNA-Schäden beobachtet.



Abbildungen 22 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt (1,3 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten (a-c), Hepatozyten (d-f) und Colonozyten (g-i) von Ratten. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen hinweg entweder Grüntee-Extrakt (1,3 mg/kg KG/T) oder Wasser mit einer Magensonde verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet und die Zellen isoliert. Pro Organ und Behandlung (Standard, FPG und Endo III) wurden drei Objektträger hergestellt und insgesamt 150 (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. 100 Zellen (Colonozyten) ausgewertet. W-Wasser, GTE-Grüntee-Extrakt. Die Boxen zeigen den Bereich von erster zu dritter Quartile, der mittlere Strich den Median, weiters ist der Bereich zwischen Minimum und Maximum dargestellt.

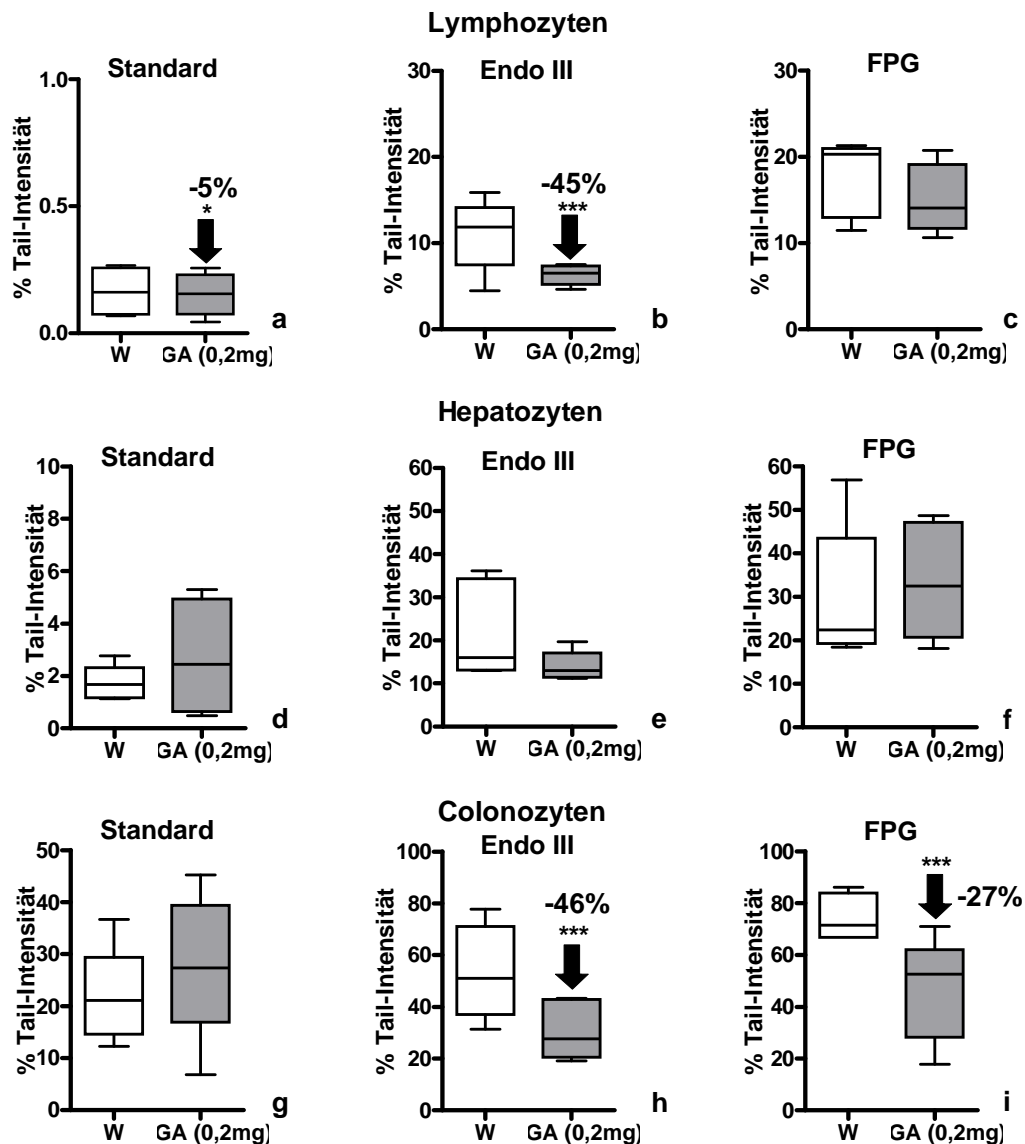
In einem weiteren Versuch wurden den Ratten 6,7 mg GTE/kg KG (eine Dosis, die dem Konsum von 5 Tassen GT beim Menschen entspricht) verabreicht (Abbildungen 23 a-i). Mit dieser Konzentration wurde in allen untersuchten Organen eine Reduktion der DNA-Migration beobachtet.



Abbildungen 23 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt (6,7 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten (a-c), Hepatozyten (d-f) und Colonozyten (g-i) von Ratten. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen hinweg entweder Grüntee-Extrakt (6,7 mg/kg KG/T) oder Wasser mit einer Magensonde verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet und die Zellen isoliert. Pro Organ und Behandlung (Standard, FPG und Endo III) wurden drei Objektträger hergestellt und insgesamt 150 (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. 100 Zellen (Colonozyten) ausgewertet. W- Wasser, GTE-Grüntee-Extrakt. Die Boxen zeigen den Bereich von erster zu dritter Quartile, der mittlere Strich den Median, weiters ist der Bereich zwischen Minimum und Maximum dargestellt. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001.

4.1.1.2. Gallussäure

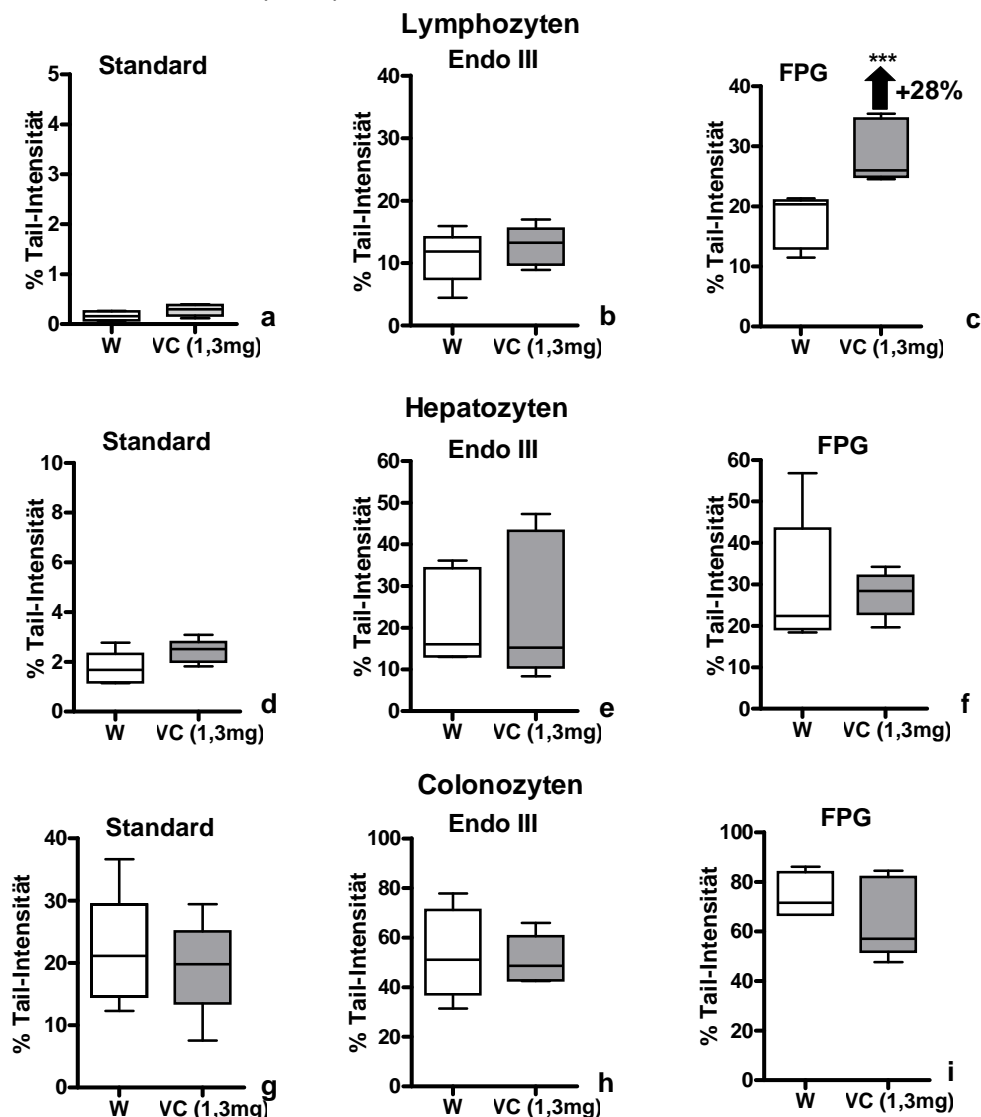
Die Ergebnisse der Experimente mit GA (0,2 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität in den diversen Zelltypen sind in den Abbildungen 24 a-i dargestellt. Es konnte eine deutliche protektive Wirkung erzielt werden. In Lymphozyten kam es mit dem läsionspezifischen Enzym Endo III zu einer Reduktion der DNA-Migration um 45%; in Colonozyten wurde eine Reduktion der DNA-Migration um 46% (Endo III) bzw. um 27% (FPG) gefunden. In Hepatozyten war im Gegensatz dazu keine Reduktion der DNA-Schäden messbar.



Abbildungen 24 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Gallussäure (0,2 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten (a-c), Hepatozyten (d-f) und Colonozyten (g-i) von Ratten. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen hinweg entweder Gallussäure (0,2 mg/kg KG/T) oder Wasser mit einer Magensonde verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet und die Zellen isoliert. Pro Organ und Behandlung (Standard, FPG und Endo III) wurden drei Objektträger hergestellt und insgesamt 150 (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. 100 Zellen (Colonozyten) ausgewertet. W-Wasser, GA-Gallussäure. Die Boxen zeigen den Bereich von erster zu dritter Quartile, der mittlere Strich den Median, weiters ist der Bereich zwischen Minimum und Maximum dargestellt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

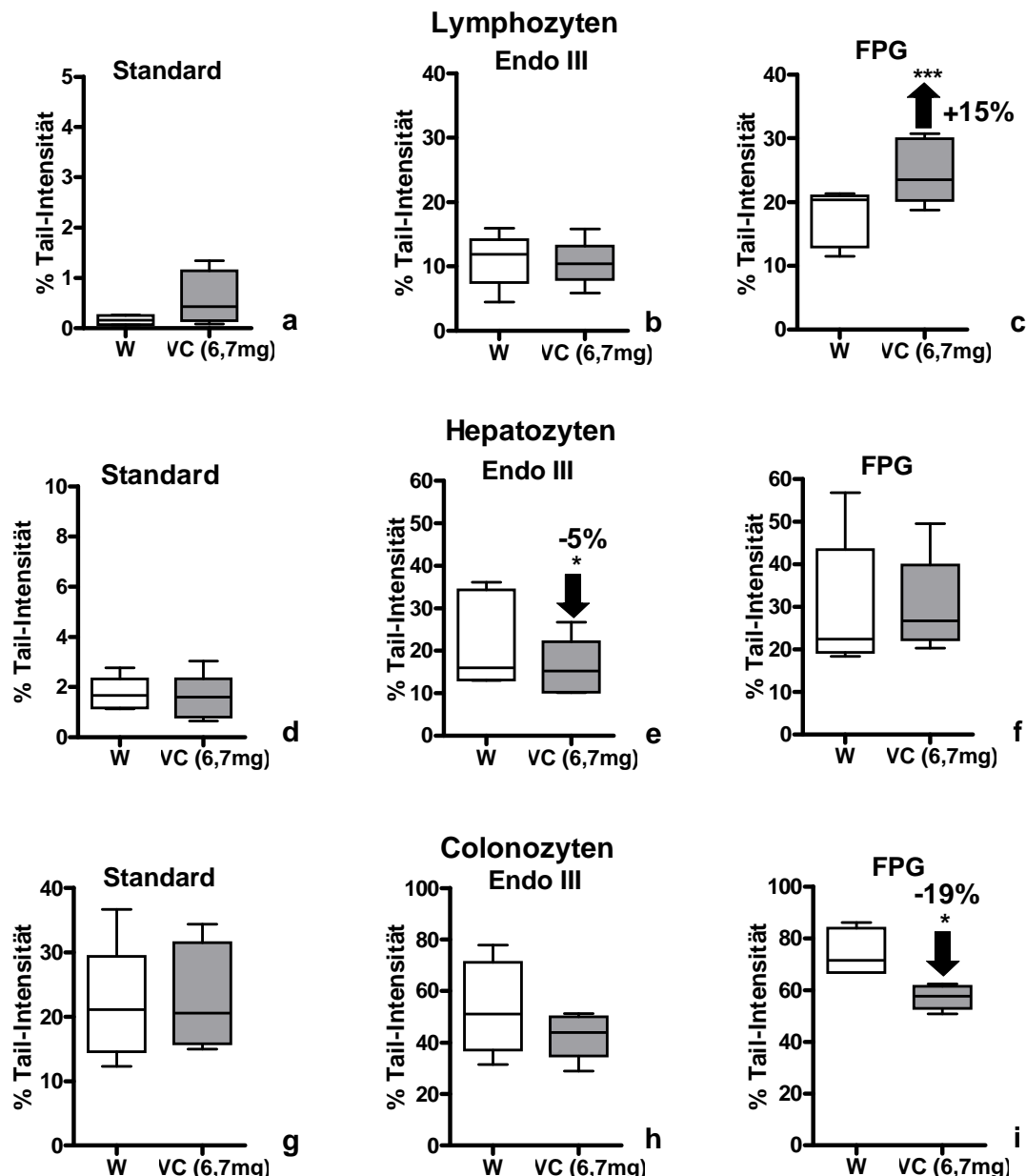
4.1.1.3. Vitamin C

Die Abbildungen 25 a-i zeigen die Auswirkungen der Verabreichung von VC (1,3 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität. In den meisten Fällen wurden keine protektiven Effekte gefunden. Die Tail-Intensität war in den Dickdarmzellen nach Behandlung mit FPG reduziert (27 %); allerdings war dieser Effekt statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu kam es nach Behandlung mit FPG in den peripheren Lymphozyten zu einer recht deutlichen Zunahme der DNA-Schäden (28 %).



Abbildungen 25 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Vitamin C (1,3 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten (a-c), Hepatozyten (d-f) und Colonozyten (g-i) von Ratten. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen hinweg entweder Vitamin C (1,3 mg/kg KG/T) oder Wasser mit einer Magensonde verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet und die Zellen isoliert. Pro Organ und Behandlung (Standard, FPG und Endo III) wurden drei Objektträger hergestellt und insgesamt 150 (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. 100 Zellen (Colonozyten) ausgewertet. W-Wasser, VC-Vitamin C. Die Boxen zeigen den Bereich von erster zu dritter Quartile, der mittlere Strich den Median, weiters ist der Bereich zwischen Minimum und Maximum dargestellt. *** $p < 0,001$.

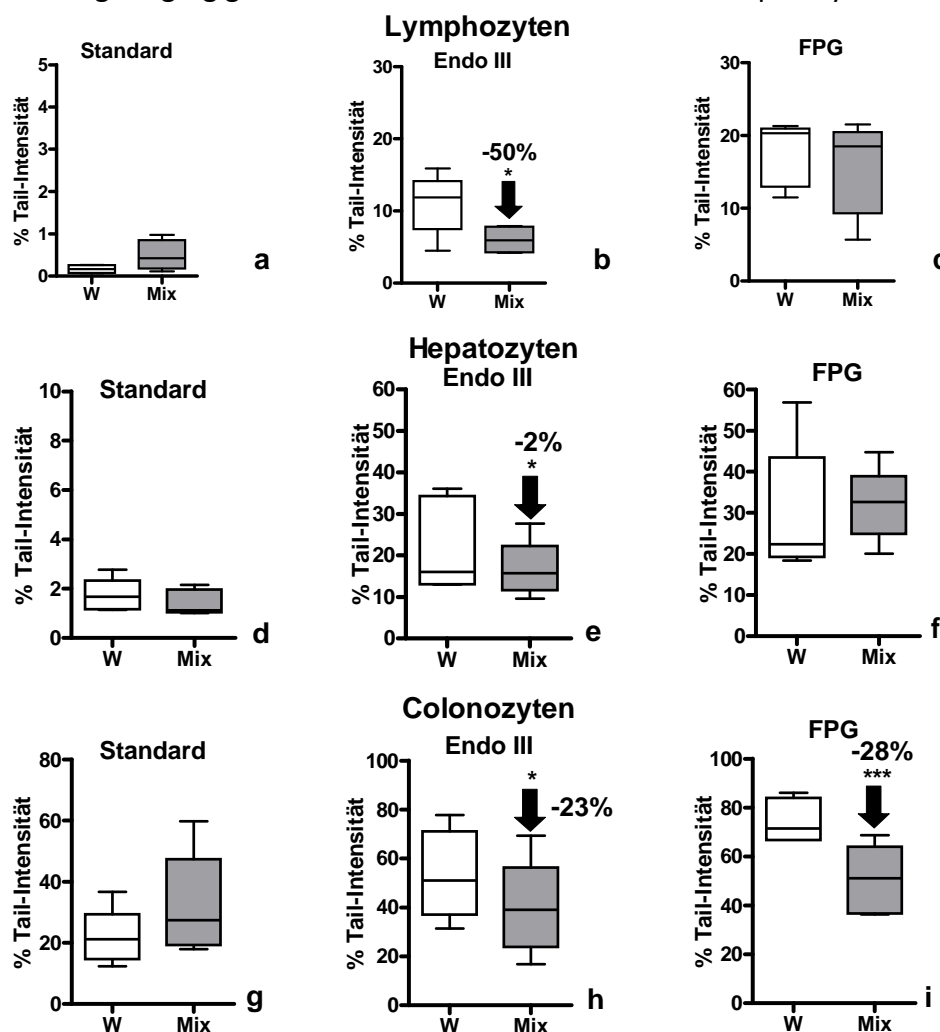
Zusätzlich zu der Dosis, die den DACH-Empfehlungen entspricht, wurde eine 5-fach höhere Konzentration (6,7 mg/kg KG) getestet (siehe Abbildungen 26 a-i). Wie mit der niedrigeren Menge wurde eine Zunahme der DNA-Schäden in den Lymphozyten nach Behandlung mit FPG beobachtet, während in den Colonozyten mit FPG eine Reduktion der DNA-Migration um 19 % festgestellt wurde.



Abbildungen 26 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Vitamin C (6,7 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten (a-c), Hepatozyten (d-f) und Colonozyten (g-i) von Ratten. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen hinweg entweder Vitamin C (6,7 mg/kg KG/T) oder Wasser mit einer Magensonde verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet und die Zellen isoliert. Pro Organ und Behandlung (Standard, FPG und Endo III) wurden drei Objektträger hergestellt und insgesamt 150 (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. 100 Zellen (Colonozyten) ausgewertet. W-Wasser, VC-Vitamin C. Die Boxen zeigen den Bereich von erster zu dritter Quartile, der mittlere Strich den Median, weiters ist der Bereich zwischen Minimum und Maximum dargestellt.. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

4.1.1.4. Kombination von Grüntee-Extrakt, Gallussäure und Vitamin C

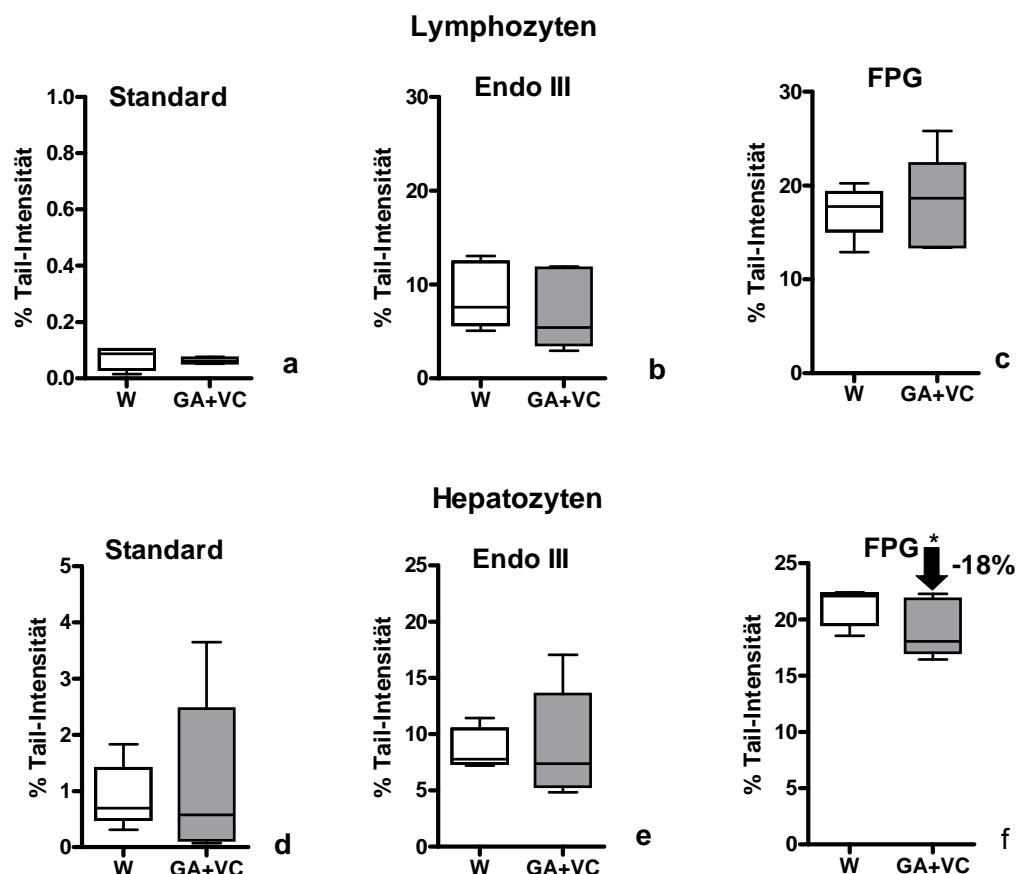
Um synergistische oder antagonistische Effekte der gleichzeitigen Verabreichung der Antioxidantien zu untersuchen, wurden die Tiere mit einem Gemisch der drei Antioxidantien behandelt (siehe Abbildungen 27 a-i). Die Dosierungen der Einzelsubstanzen entsprachen jenen, die in den vorangegangenen Experimenten eingesetzt worden waren (1,3 mg GTE/kg KG, 0,2 mg GA/kg KG, 6,7 mg VC/kg KG). Es wurde in allen Organen eine signifikante Reduktion der DNA-Migration beobachtet, die Effekte waren jenen die durch GA ausgelöst worden waren, sehr ähnlich. Zusätzlich zu einer stark protektiven Wirkung in den Lymphozyten wurde auch eine geringfügige Abnahme der DNA-Schäden in den Hepatozyten festgestellt.



Abbildungen 27 a-i: Auswirkungen einer Kombination (1,3 mg GTE, 0,2 mg GA, 6,7 mg VC/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten (a-c), Hepatozyten (d-f) und Colonozyten (g-i) von Ratten. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen hinweg entweder eine Kombination oder Wasser mit einer Magensonde verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet und die Zellen isoliert. Pro Organ und Behandlung (Standard, FPG und Endo III) wurden drei Objektträger hergestellt und insgesamt 150 (Blut- und Leberzellen) bzw. 100 Zellen (Colonozyten) ausgewertet. W-Wasser, Mix-Mischung. Die Boxen zeigen den Bereich von erster zu dritter Quartile, der mittlere Strich den Median, weiters ist der Bereich zwischen Minimum und Maximum dargestellt. *p<0,05, ***p<0,001.

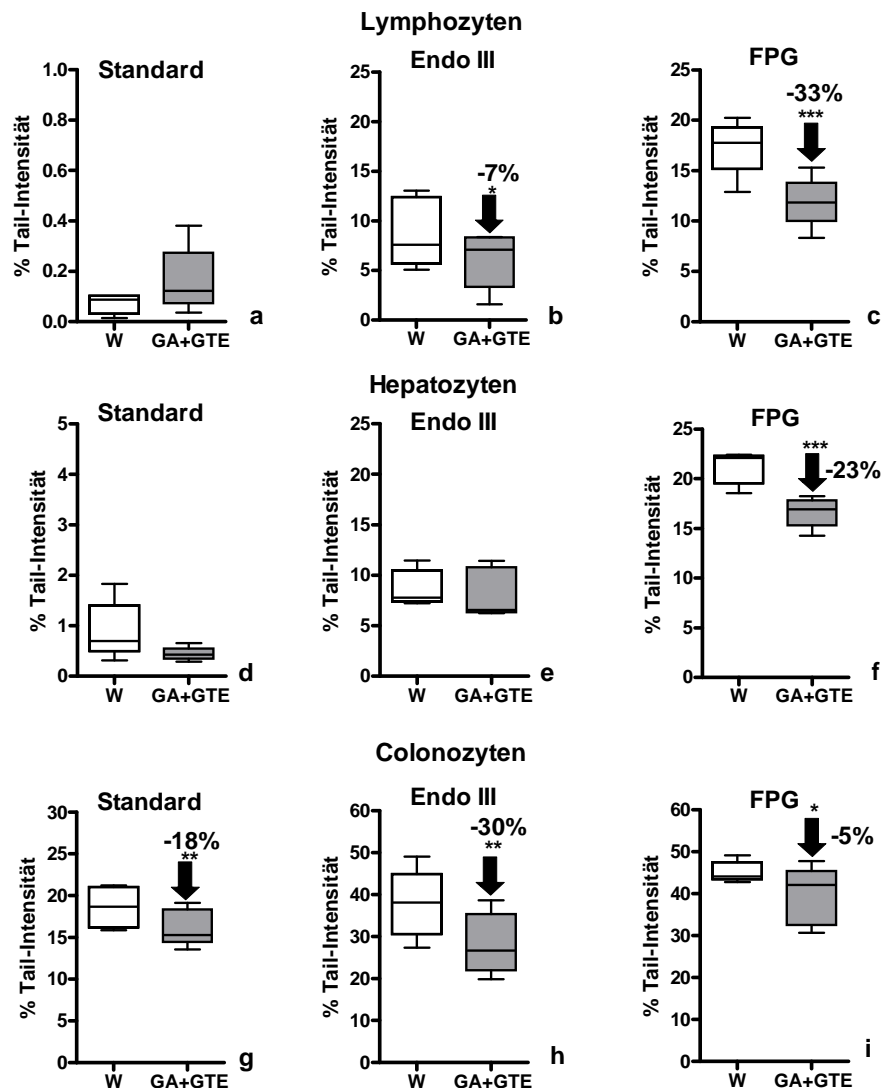
4.1.1.5. Effekte binärer Mischungen

Im Anschluss an die vorliegende Studie wurden ergänzende Experimente durchgeführt. Die Tiere wurden mit binären Kombinationen, nämlich GA und GTE bzw. GA und VC behandelt um herauszufinden, ob diese Gemische stärkere Wirkung verursachen als die Kombination aller drei Antioxidantien. Die Kombination aus VC und GTE wurde nicht getestet, da keine der beiden Einzelfaktoren deutliche Schutzeffekte bewirkte (siehe Abbildungen 26 a-i, Seite 56 und Abbildungen 22 a-i, Seite 52). Die Auswirkungen der Verabreichung einer **Kombination von GA und VC** auf die DNA-Migration in Lymphozyten und Hepatozyten sind in den Abbildungen 28 a-f dargestellt. In Lymphozyten konnten keine Schutzeffekte beobachtet werden, in Hepatozyten kam es einer Reduktion der DNA-Schäden um 18% (FPG).



Abbildungen 28 a-f: Auswirkungen oraler Verabreichung einer Kombination von Gallussäure (0,2 mg/kg KG) und Vitamin C (6,7 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten (a-c) und Hepatozyten (d-f) von Ratten. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen hinweg entweder eine Kombination (0,2 mg GA und 6,7 mg VC/kg KG/T) oder Wasser mit einer Magensonde verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet und die Zellen isoliert. Pro Organ und Behandlung (Standard, FPG und Endo III) wurden drei Objektträger hergestellt und insgesamt 150 Zellen ausgewertet. W-Wasser, GA+VC- Kombination aus Gallussäure und Vitamin C. Die Boxen zeigen den Bereich von erster zu dritter Quartile, der mittlere Strich den Median, weiters ist der Bereich zwischen Minimum und Maximum dargestellt. *p<0,05.

Die Auswirkungen der Verabreichung einer **Kombination von GA und GTE** auf die DNA-Stabilität in Blut, Leber und Kolon sind in den Abbildungen 29 a-i dargestellt. In diesem Experiment konnten in allen Organen protektive Wirkungen beobachtet werden. In den Lymphozyten kam es zu einer Reduktion der DNA-Schäden um 33 % (FPG) bzw. um 7 % (Endo III). In den Colonozyten konnten unter allen Versuchsbedingungen protektive Effekte nachgewiesen werden, und auch in den Leberzellen kam es zu einer Reduktion der DNA-Migration mit FPG (-23 %).



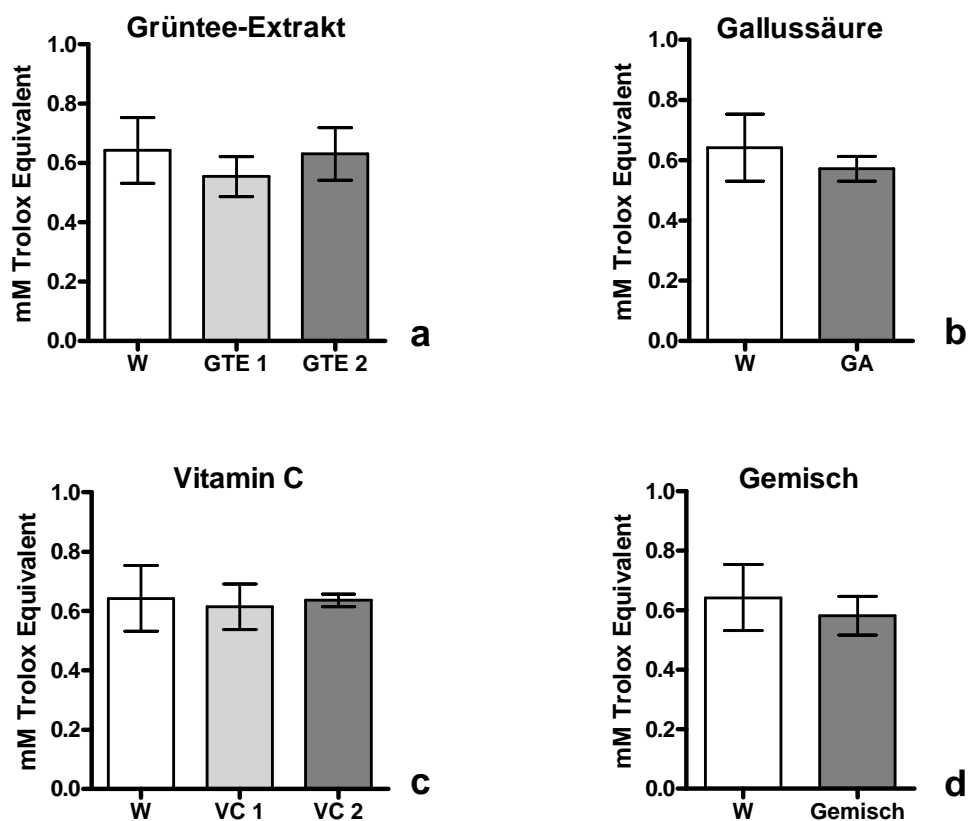
Abbildungen 29 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung einer Kombination von Gallussäure (0,2 mg/kg KG) und Grüntee-Extrakt (1,3 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten (a-c), Hepatozyten (d-f) und Colonozyten (g-i) von Ratten. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen hinweg entweder eine Kombination (0,2 mg GA und 1,3 mg GTE/kg KG/T) oder Wasser mit einer Magensonde verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet und die Zellen isoliert. Pro Organ und Behandlung (Standard, FPG und Endo III) wurden drei Objektträger hergestellt und insgesamt 150 (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. 100 Zellen (Colonozyten) ausgewertet. W-Wasser, GA+GTE- Gallussäure und Grüntee-Extrakt. Die Boxen zeigen den Bereich von erster zu dritter Quartile, der mittlere Strich den Median, weiters ist der Bereich zwischen Minimum und Maximum dargestellt. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001.

4.1.2. Messung der biochemischen Parameter

In den nachfolgenden Abschnitten sind die Resultate der Messung der biochemischen Parameter beschrieben.

4.1.2.1. Gesamte antioxidative Kapazität (TEAC)

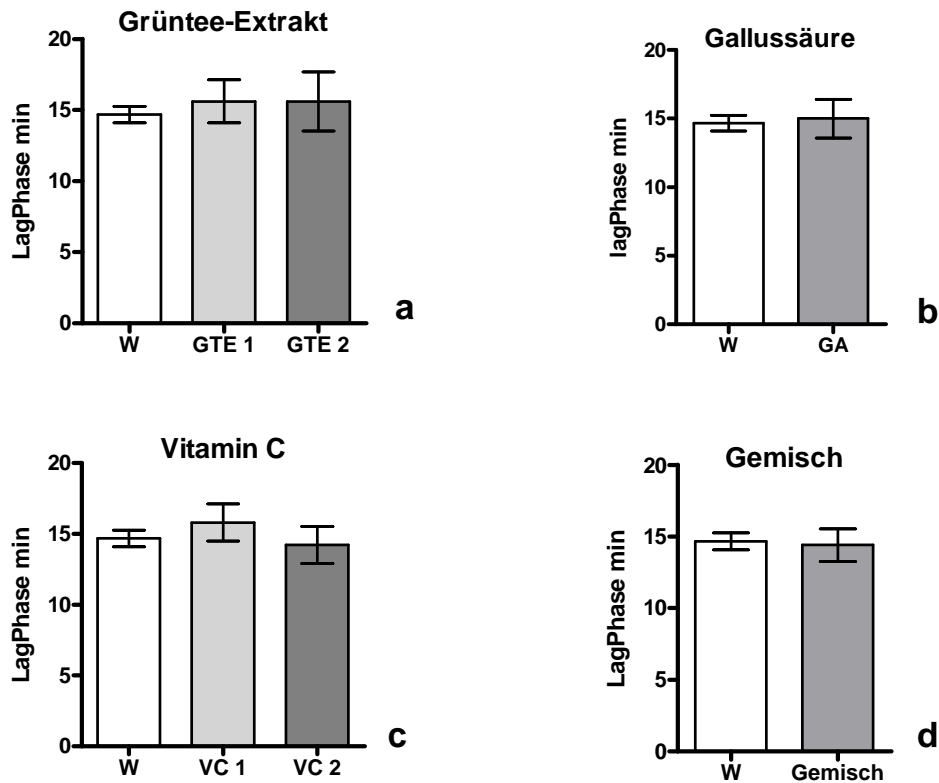
Die Auswirkungen von GTE, GA und VC auf die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma sind in den Abbildungen 30 a-d dargestellt. Keine der Behandlungen führt zu einer signifikanten Änderung der TEAC.



Abbildungen 30 a-d: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt (a), Gallussäure (b), Vitamin C (c) und einer Kombination der drei Antioxidantien (d) auf die gesamte antioxidative Kapazität (TEAC) in Plasma von Ratten. Den Ratten wurde entweder Grüntee-Extrakt (1,3mg oder 6,7mg/kg KG/T), Gallussäure (0,2mg/kg KG/T), Vitamin C (1,3mg oder 6,7mg/kg KG/T), ein Gemisch der drei Schutzsubstanzen (1,3 mg GTE, 0,2 mg GA, 6,7 mg VC/kg KG/T) oder Wasser (Kontrolle) über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet, das Blut gesammelt und das Plasma durch Zentrifugation abgetrennt. Die TEAC-Werte wurden spektrophotometrisch nach der Methode von Miller et al. [157] ermittelt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der fünf Tiere pro Gruppe und die entsprechenden Standardabweichungen. W- Wasser, GTE 1- 1,3 mg Grüntee-Extrakt, GTE 2- 6,7 mg Grüntee-Extrakt, GA- Gallussäure, VC 1 – 1,3 mg Vitamin C, VC 2- 6,7mg Vitamin C, Gemisch- Kombination der drei Substanzen Gemisch (1,3 mg GTE, 0,2 mg GA, 6,7 mg VC).

4.1.2.2. LDL-Oxidation

Die Ergebnisse der Messungen der LDL-Oxidation im Plasma sind in den Abbildungen 31 a-d dargestellt. Keines der verabreichten Antioxidantien führte zu einer Änderung dieses Parameters.



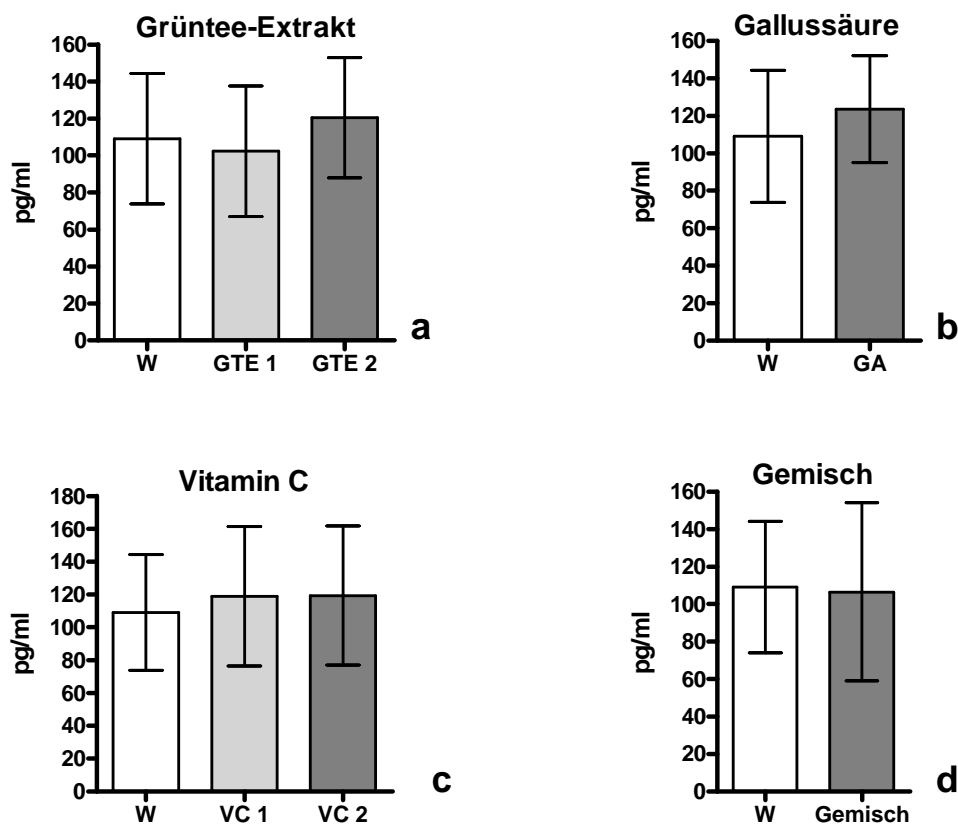
Abbildungen 31 a-d: Auswirkungen oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt (a), Gallussäure (b), Vitamin C (c) und einer Kombination der drei Antioxidantien (d) auf die LDL-Oxidation in Plasma von Ratten. Den Ratten wurde entweder Grüntee-Extrakt (1,3 mg oder 6,7 mg/kg KG/T), Gallussäure (0,2 mg/kg KG/T), Vitamin C (1,3mg oder 6,7 mg/kg KG/T), eine Kombination der drei Schutzsubstanzen (1,3mg GTE, 0,2mg GA, 6,7mg VC/kg KG/T) oder Wasser (Kontrolle) über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet, das Blut gesammelt und das Plasma durch Zentrifugation abgetrennt. Die LagPhase-Werte wurden fluorimetrisch entsprechend der Methode von Hofer et al. [165] ermittelt. Die Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Die Balken entsprechen den Mittelwerten der fünf Tiere pro Gruppe und den jeweiligen Standardabweichungen. W-Wasser, GTE 1- 1,3 mg Grüntee-Extrakt, GTE 2- 6,7 mg Grüntee-Extrakt, GA- Gallussäure, VC 1 – 1,3 mg Vitamin C, VC 2- 6,7 mg Vitamin C, Gemisch- Kombination der drei Substanzen (1,3 mg GTE, 0,2 mg GA, 6,7 mg VC).

4.1.3. Immunologische Parameter

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Messungen der immunologischen Parameter beschrieben.

4.1.3.1. Tumor Nekrose Faktor α

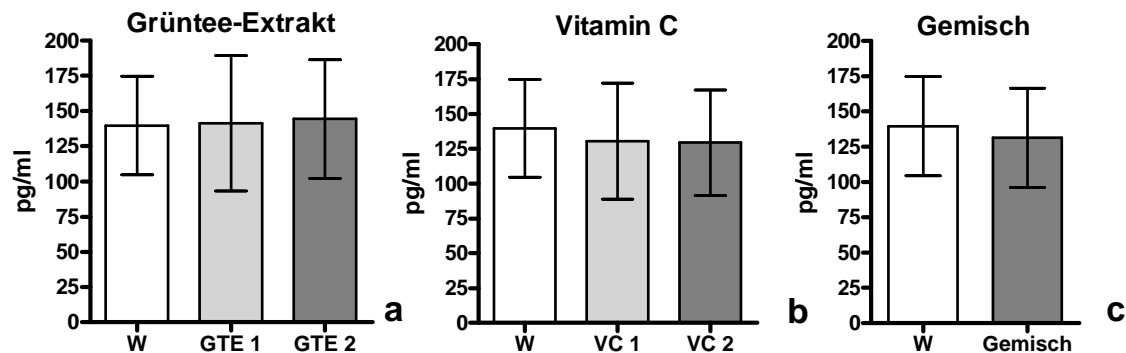
Die Ergebnisse der Messungen des TNF- α sind in den Abbildungen 32 a-d dargestellt. Keine der Verbindungen bewirkte eine Veränderung der TNF- α Konzentrationen im Plasma.



Abbildungen 32 a-d: Auswirkung oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt (a), Gallussäure (b), Vitamin C (c) und einer Kombination der drei Antioxidantien(d) auf die TNF- α Konzentrationen in Plasma von Ratten Den Ratten wurde entweder Grüntee-Extrakt (1,3 mg oder 6,7 mg/kg KG/T), Gallussäure (0,2 mg/kg KG/T), Vitamin C (1,3mg oder 6,7 mg/kg KG/T), eine Kombination der drei Schutzsubstanzen (1,3 mg GTE, 0,2 mg GA, 6,7 mg VC/kg KG/T) oder Wasser (Kontrolle) über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet, das Blut gesammelt und das Plasma durch Zentrifugation abgetrennt und die TNF- α -Werte mit einem ELISA-Kit bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der fünf Tiere pro Gruppe und die jeweiligen Standardabweichungen. W-Wasser, GTE 1- 1,3 mg Grüntee-Extrakt, GTE 2 – 6,7 mg Grüntee-Extrakt, GA- 0,2 mg Gallussäure, VC 1- 1,3 mg Vitamin C, VC 2- 6,7 mg Vitamin C, Gemisch-Kombination der drei Substanzen (1,3 mg GTE, 0,2 mg GA, 6,7 mg VC).

4.1.3.2. Interferon γ

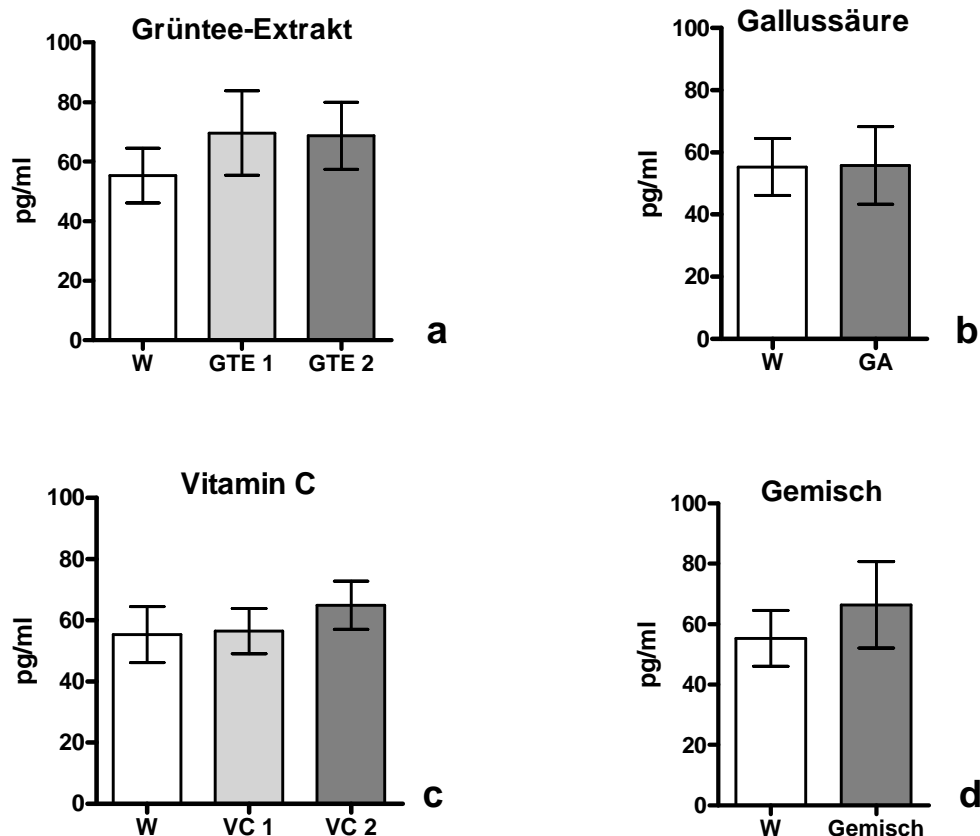
Die Auswirkungen von GTE, VC und einer Kombination von GTE, VC und GA auf die IFN- γ -Konzentrationen im Plasma der Versuchstiere sind in den Abbildungen 33 a-c dargestellt. Von den mit GA behandelten Tieren konnte nicht genug Plasma für die Messung dieses Parameters gesammelt werden. Keine der Substanzen bewirkte eine Veränderung der IFN- γ Werte.



Abbildungen 33 a-c: Auswirkung oraler Verabreichung von Grüntee-Extrakt (a), Vitamin C (b) und einem Gemisch der drei Antioxidantien (c) auf die IFN- γ Konzentrationen in Plasma von Ratten. Den Ratten wurde entweder Grüntee-Extrakt (1,3 mg oder 6,7 mg/kg KG/T), Vitamin C (1,3mg oder 6,7 mg/kg KG/T), eine Kombination der drei Schutzsubstanzen (1,3 mg GTE, 0,2 mg GA, 6,7 mg VC/kg KG/T) oder Wasser (Kontrolle) über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet, das Blut gesammelt, das Plasma durch Zentrifugation abgetrennt und die IFN- γ -Werte mit einem ELISA-Kit bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der fünf Tiere pro Gruppe und die entsprechenden Standardabweichungen. W-Wasser, GTE 1- 1,3mg Grüntee-Extrakt, GTE 2 – 6,7 mg Grüntee-Extrakt, VC 1- 1,3 mg Vitamin C, VC 2- 6,7 mg Vitamin C, Gemisch- Kombination aus 1,3 mg GTE, 0,2 mg GA und 6,7 mg VC.

4.1.3.3. Interleukin 4

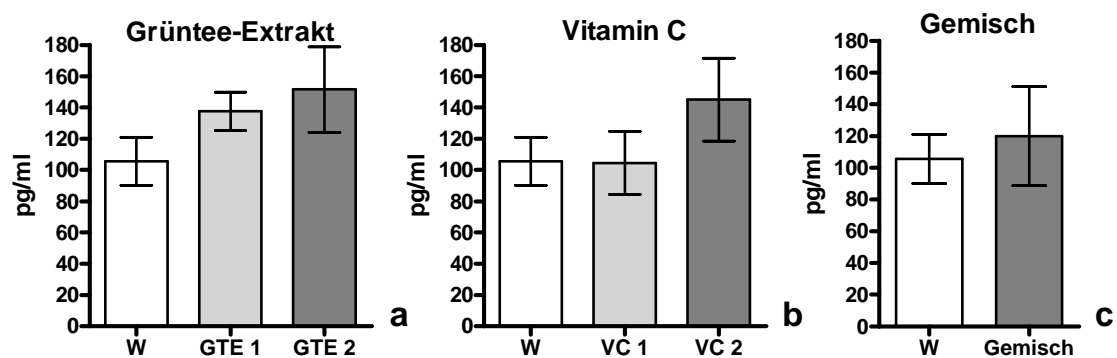
Die Abbildungen 34 a-d zeigen die Auswirkungen der Behandlung mit verschiedenen antioxidativ wirkenden Substanzen auf die IL-4-Konzentrationen im Plasma von Ratten. Weder die einzelnen Antioxidantien noch eine Kombination aller drei führten zu einer Änderung dieses Parameters.



Abbildungen 34 a-d: Auswirkungen der Verabreichung von Grüntee-Extrakt (a), Gallussäure (b), Vitamin C (c) und einem Gemisch der drei Antioxidantien (d) auf die IL-4 Konzentrationen in Plasma von Ratten. Den Ratten wurde entweder Grüntee-Extrakt (1,3 mg oder 6,7 mg/kg KG/T), Gallussäure (0,2 mg/kg KG/T), Vitamin C (1,3 mg oder 6,7 mg/kg KG/T), eine Kombination der drei Schutzsubstanzen (1,3 mg GTE, 0,2 mg GA, 6,7 mg VC/kg KG/T) oder Wasser (Kontrolle) über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet, das Blut gesammelt, das Plasma durch Zentrifugation abgetrennt und die IL-4-Werte mit einem ELISA-Kit bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der fünf Tiere pro Gruppe und die jeweiligen Standardabweichungen. W-Wasser, GTE 1- 1,3 mg Grüntee-Extrakt, GTE 2 – 6,7 mg Grüntee-Extrakt, GA- 0,2 mg Gallussäure, VC 1- 1,3 mg Vitamin C, VC 2- 6,7 mg Vitamin C, Gemisch-Kombination von 1,3 mg GTE, 0,2 mg GA und 6,7 mg VC.

4.1.3.4. Interleukin 10

Die Abbildungen 35 a-c zeigen die Auswirkungen von GTE, VC und einer Kombination von drei Antioxidantien (GTE, GA, VC) auf die IL-10-Konzentrationen in Plasma. Von den Tieren der Gruppe, die ausschließlich mit GA behandelt wurden, konnte nicht genug Plasma für die Bestimmung dieses Parameters gesammelt werden. Es wurde keine signifikante Veränderung der Werte beobachtet.



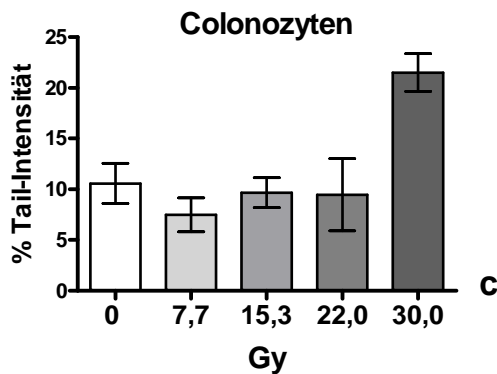
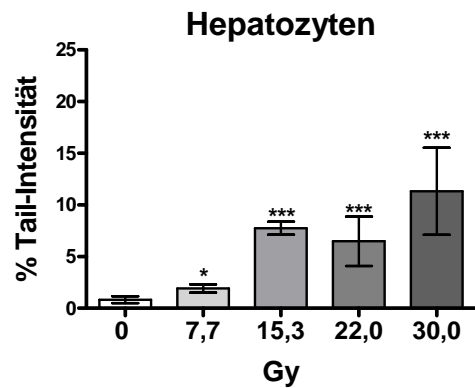
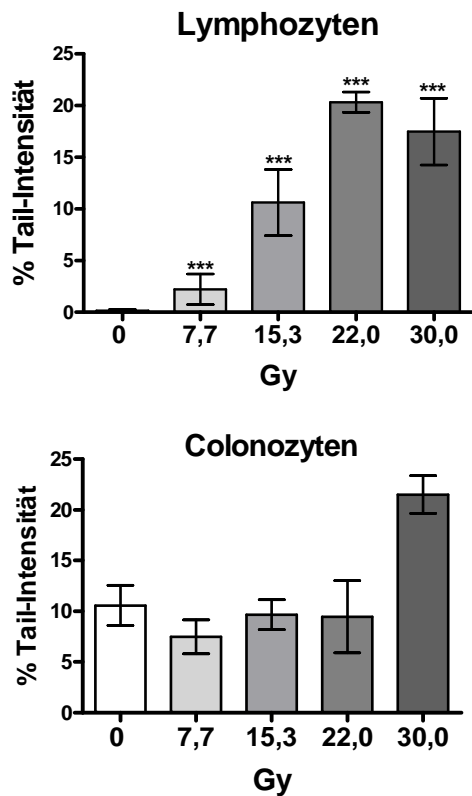
Abbildungen 35 a-c: Auswirkungen der Verabreichung von Grüntee-Extrakt (a), Vitamin C (b) und einem Gemisch der drei Antioxidantien (c) auf die IL-10-Konzentrationen in Plasma von Ratten. Den Ratten wurde entweder Grüntee-Extrakt (1,3 mg oder 6,7 mg/kg KG/T), Vitamin C (1,3mg oder 6,7 mg/kg KG/T), eine Kombination der drei Schutzsubstanzen (1,3 mg GTE, 0,2 mg G, 6,7 mg VC/kg KG/T) oder Wasser (Kontrolle) über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden die Tiere getötet, das Blut gesammelt, das Plasma durch Zentrifugation abgetrennt und die IL-10-Werte mit einem ELISA-Kit bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte der fünf Tiere pro Gruppe und die jeweiligen Standardabweichungen. W-Wasser, GTE 1- 1,3 mg/kg, Grüntee-Extrakt, GTE 2 – 6,7 mg Grüntee-Extrakt, VC 1- 1,3 mg Vitamin C, VC 2- 6,7 mg Vitamin C, Gemisch- Kombination von 1,3 mg GTE, 0,2 mg GA, 6,7 mg VC.

4.2. Experimente mit bestrahlten Tieren

Im zweiten Teil der Studie wurden die Tiere nach Behandlung mit GA bzw. einem Gemisch dreier Antioxidantien einer einmaligen Ganzkörper-Bestrahlung in einer ^{60}Co -Quelle unterworfen.

4.2.1. Kalibrationsexperimente

Vor Beginn der Experimente wurde jene Strahlendosis ermittelt, die optimal geeignet ist, potentielle präventive Wirkungen der Testsubstanzen zu detektieren. Um die Anzahl der Tiere möglichst gering zu halten, wurde für diese Experimente jeweils eine Ratte pro Dosierung herangezogen. Die Abbildungen 36 a-c (nächste Seite) zeigen die Ergebnisse der Kalibrationsexperimente.



Abbildungen 36 a-c: Oxidative DNA-Schäden in Lymphozyten (a), Hepatozyten (b) und Colonozyten (c) von Ratten nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Gamma-Dosen (7.7, 15.3, 22.0 und 30.0 Gy) in einer ^{60}Co -Quelle. Die Balken sind die Mittelwerte dreier Mediane einer Ratte \pm SD. Experimenteller Aufbau wie in Abb. 20, S.44, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

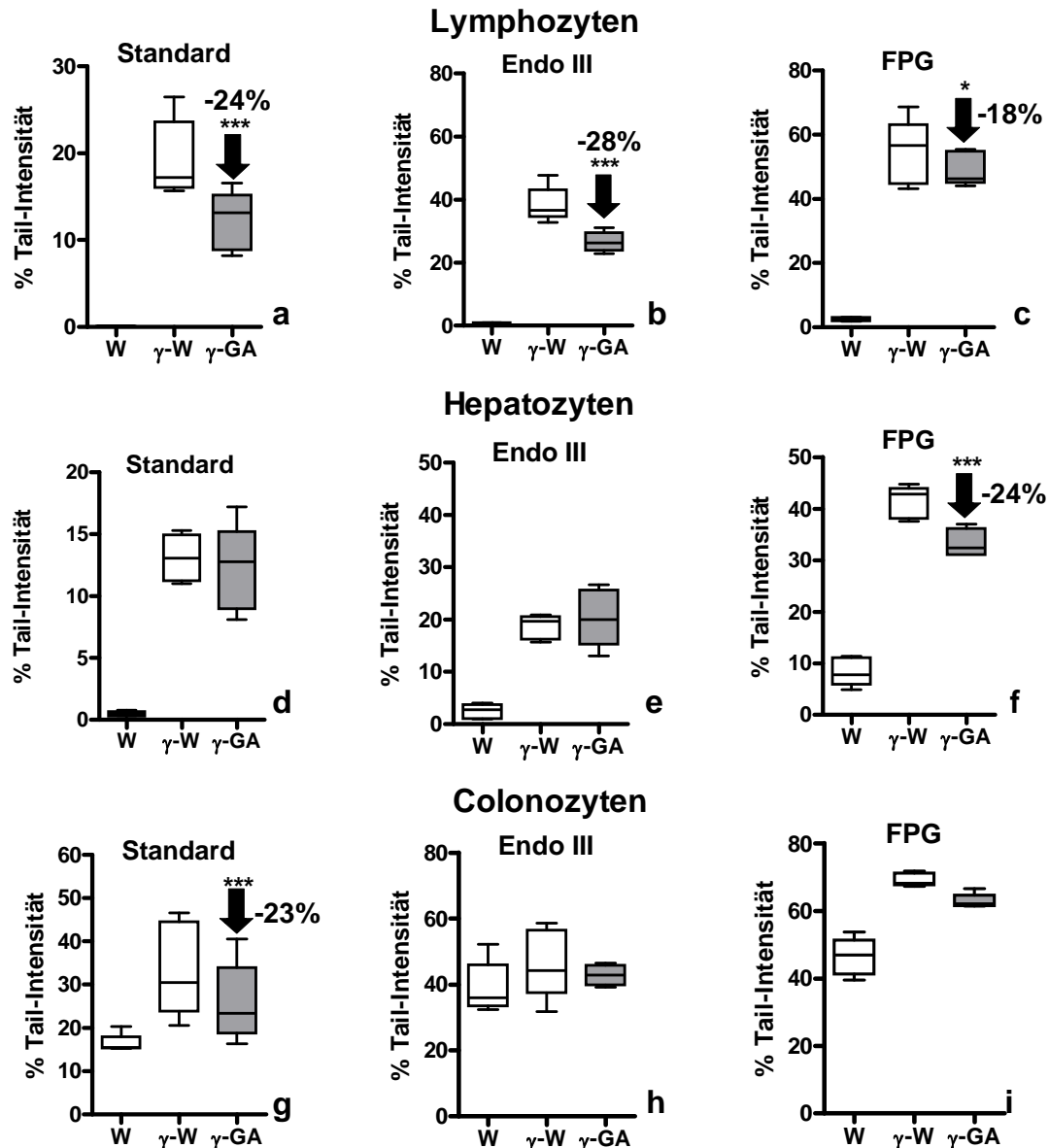
Die Lymphozyten reagierten besonders empfindlich auf die Induktion von ROS. Bereits bei niedrigen Dosierungen wurde eine starke Zunahme der Tail-Intensitäten der Kometen festgestellt. Hepatozyten und Colonozyten reagierten weniger empfindlich, in den Darmzellen wurde ein starker, nicht signifikanter Anstieg der DNA-Schäden erst bei der höchsten Strahlendosis (30 Gy, ohne Abschwächer= 50,9 sec, Dosis: 2.986,55 Ci) gefunden.

4.2.2 Ergebnisse der SCGE-Tests mit bestrahlten Tieren

Auch im zweiten Teil der Studie wurden die läsionsspezifischen Enzyme in einer Verdünnung von 1:1000 (FPG) bzw. 1:9000 (Endo III) verwendet. Die Behandlung der Nuklei mit Endo III und FPG führte in allen Experimenten zu einer deutlichen Zunahme der DNA-Schäden. Im Fall der Nuclease (Endo III) wurde im Durchschnitt eine 1,5-fache Erhöhung gefunden, und mit der Glykosylase (FPG) eine Verdopplung der % Tail-Intensität im Vergleich zu den jeweiligen Puffer-Werten gemessen.

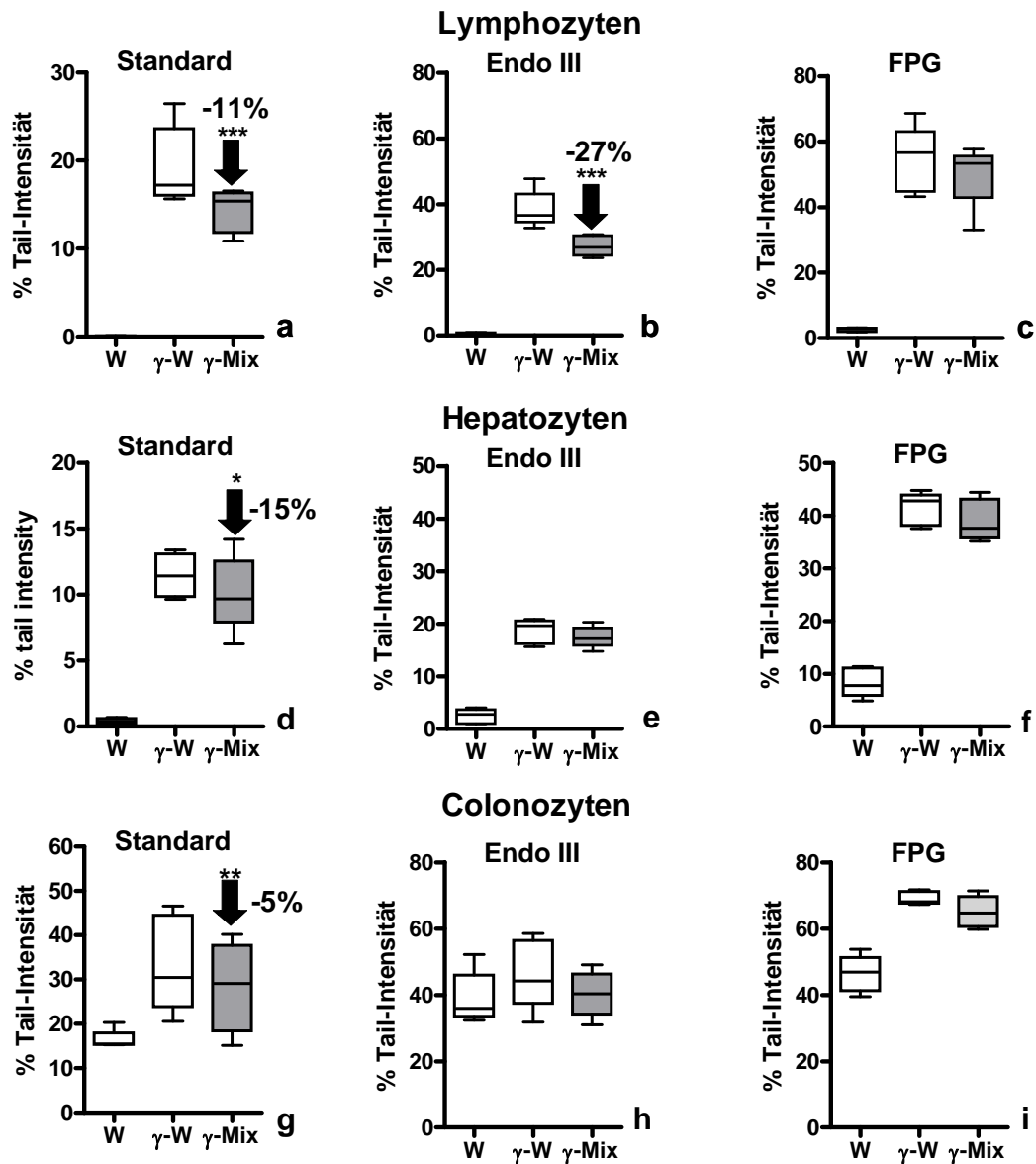
Gamma-Bestrahlung bewirkte in allen Organen und unter allen Versuchsbedingungen (Standard, Endo III und FPG) einen deutlichen und signifikanten Anstieg der DNA-Schäden und entsprach den Resultaten, die in den Kalibrationsexperimenten erhalten wurden.

Die Auswirkungen von **GA** (0,2 mg/kg KG) auf die DNA-Migration in Blut, Leber und Colon der bestrahlten Tiere sind in den Abbildungen 37 a-i dargestellt. Unter allen Versuchsbedingungen konnte eine klare protektive Wirkung der Gallussäure in Lymphozyten beobachtet werden. Zusätzlich wurde in den Leberzellen (mit FPG) und in den Colonozyten (Standard-Bedingungen) eine Reduktion der DNA-Migration gefunden.



Abbildungen 37 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung von Gallussäure (0,2 mg/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten (a-c), Hepatozyten (d-f) und Colonozyten (g-i) bestrahlter Ratten. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen entweder Gallussäure (0,2mg/kg KG/T) oder Wasser mit einer Magensonde verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden eine Kontroll- und die Gallussäure-Gruppe einer Ganzkörperbestrahlung (30 Gy) unterworfen, nachfolgend wurden die Tiere getötet und die Zellen isoliert. Pro Organ und Behandlung (Standard, FPG und Endo III) wurden drei Objekträger hergestellt und insgesamt 150 (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. 100 Zellen (Colonozyten) ausgewertet. W-Wasser, γ-W bestrahlte Wasser-Gruppe, γ-GA bestrahlte Gallussäure-Gruppe. Die Boxen zeigen den Bereich von erster zu dritter Quartile, der mittlere Strich den Median, weiters ist der Bereich zwischen Minimum und Maximum dargestellt.*p<0,05, ***p<0,001.

Die Resultate der SCGE-Tests, die mit der **Kombination** von GTE, GA und VC erhalten wurden, sind in Abbildungen 38 a-i dargestellt. In allen untersuchten Organen wurden Schutzeffekte gefunden, wobei die deutlichste Reduktion der DNA-Migration in den Lymphozyten beobachtet wurde.



Abbildungen 38 a-i: Auswirkungen oraler Verabreichung eines Gemisches von drei Antioxidantien (1,3 mg GTE, 0,2 mg G, 6,7 mg VC/kg KG) auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten (a-c), Hepatozyten (d-f) und Colonozyten (g-i) von bestrahlten Ratten. Den Tieren wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg entweder ein Gemisch der drei Antioxidantien oder Wasser mit einer Magensonde verabreicht. 24 h nach der letzten Behandlung wurden eine Kontroll- und die Gemisch-Gruppe einer Ganzkörperbestrahlung (30 Gy) unterworfen, nachfolgend wurden die Tiere getötet und die Zellen isoliert. Pro Organ und Behandlung (Standard, FPG und Endo III) wurden drei Objektträger hergestellt und insgesamt 150 (Lymphozyten und Hepatozyten) bzw. 100 Zellen (Colonozyten) ausgewertet. W-Wasser, γ -W – bestrahlte Wasser-Gruppe, γ -Mix-bestrahlte Gemisch-Gruppe. Die Boxen zeigen den Bereich von erster zu dritter Quartile, der mittlere Strich den Median, weiters ist der Bereich zwischen Minimum und Maximum dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$.

4.2.3. Messung biochemischer Parameter mit bestrahlten Tieren

4.2.3.1. Gesamte antioxidative Kapazität (TEAC)

Abbildung 39 zeigt die Auswirkungen einer fünftägigen Behandlung mit GA oder einer Kombination von GTE, GA und VC auf die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma bestrahlter Ratten. Es ist deutlich zu erkennen, dass weder die Bestrahlung noch die Vorbehandlung der Tiere mit den Antioxidantien zu einer Änderung dieses Parameters führten

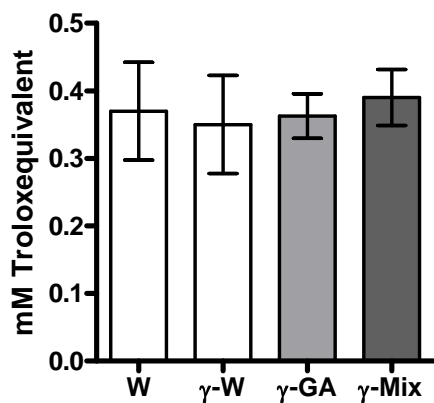


Abbildung 39: Auswirkungen von Gallussäure und einer Kombination von Antioxidantien auf die gesamte antioxidative Kapazität (TEAC) des Plasmas bestrahlter Ratten. Die Ratten wurden wie in Abb. 17. (S. 41) beschrieben behandelt. Anschließend wurden eine Kontroll-, die Gallussäure- und die Gemisch-Gruppe bestrahlt, getötet, das Blut gesammelt und das Plasma mittels Zentrifugation abgetrennt. Die TEAC-Werte wurden spektrophotometrisch nach der Methode von Miller et al. [157] ermittelt. Die Balken zeigen Mittelwerte von fünf Tieren pro Gruppe und die jeweiligen Standardabweichungen. W-Wasser, γ-W-Wasser-Gruppe bestrahlt, γ-GA- Gallussäure-Gruppe bestrahlt, γ-Mix- Kombinations-Gruppe bestrahlt

4.2.3.2. LDL-Oxidation

Die Effekte der GA oder einer Kombination der drei Antioxidantien auf die LDL-Oxidation sind in Abbildung 40 dargestellt. Weder die Bestrahlung noch die Behandlung der Tiere mit den Antioxidantien nach der Bestrahlung führten zu einer Änderung dieses Parameters.

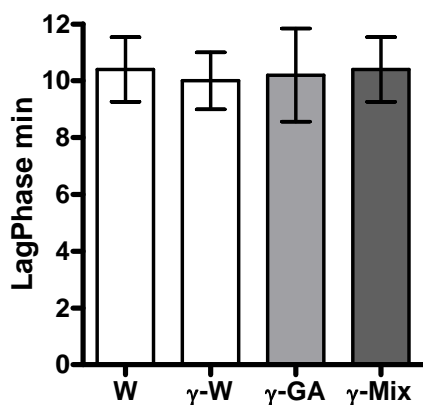


Abbildung 40: Auswirkungen von Gallussäure und einer Kombination von Antioxidantien auf die LDL-Oxidation des Plasmas bestrahlter Ratten. Die Ratten wurden wie in Abb. 17 (S. 41) beschrieben behandelt. Anschließend wurde eine Kontroll-, die Gallussäure- und die Gemisch-Gruppe bestrahlt, getötet, das Blut gesammelt und das Plasma mittels Zentrifugation abgetrennt. Die LDL-Oxidation wurde fluorimetrisch nach der Methode von Hofer et al. [160,165] bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte von fünf Tieren pro Gruppe und die jeweiligen Standardabweichungen. W-Wasser, γ-W-Wasser-Gruppe bestrahlt, γ-GA- Gallussäure-Gruppe bestrahlt, γ-Mix- Kombinations-Gruppe bestrahlt.

4.2.4. Immunologische Parameter

4.2.4.1. Tumor Nekrose Faktor α

Die Auswirkungen der Behandlung mit GA und einer Kombination der drei Antioxidantien auf die TNF- α Konzentrationen sind in Abbildung 41 dargestellt. Nach γ -Bestrahlung wurde ein Anstieg um 39 % im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt, dieser Effekt war statistisch nicht signifikant.

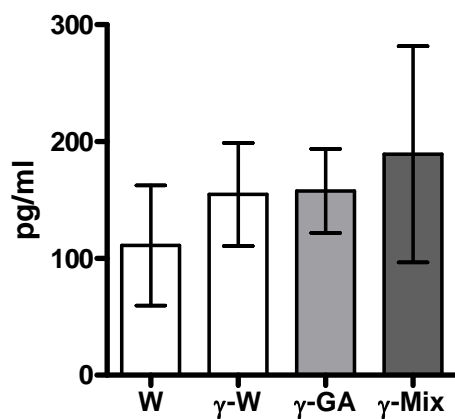


Abbildung 41: Auswirkungen von Gallussäure und einer Kombination von Antioxidantien auf die TNF- α -Konzentration im Plasma bestrahlter Ratten. Die Ratten wurden wie in Abb. 17 (S. 41) beschrieben behandelt. Anschließend wurde eine Kontroll-, die Gallussäure- und die Gemisch-Gruppe bestrahlt, getötet, das Blut gesammelt und das Plasma mittels Zentrifugation abgetrennt. Der TNF- α -Werte wurde mit einem ELISA-Kit bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte von fünf Tieren pro Gruppe und die jeweiligen Standardabweichungen. W-Wasser, γ -W-Wasser-Gruppe bestrahlt, γ -GA- Gallussäure-Gruppe bestrahlt, γ -Mix- Kombinations-Gruppe bestrahlt.

4.2.4.2. Interferon γ

Abbildung 42 (nächste Seite) zeigt die Auswirkungen oraler Administration von GA und einer Kombination der drei Antioxidantien auf die IFN- γ -Werte im Plasma bestrahlter Tiere. Wie bei den TNF- α -Konzentrationen wurde eine Zunahme um 23 % nach der Bestrahlung der Tiere beobachtet. Das Gemisch veränderte die IFN- γ Konzentrationen nicht, mit GA wurde ein schwacher Induktionseffekt (26 % im Vergleich zur Bestrahlungsgruppe) detektiert. Keiner dieser Effekte war statistisch signifikant.

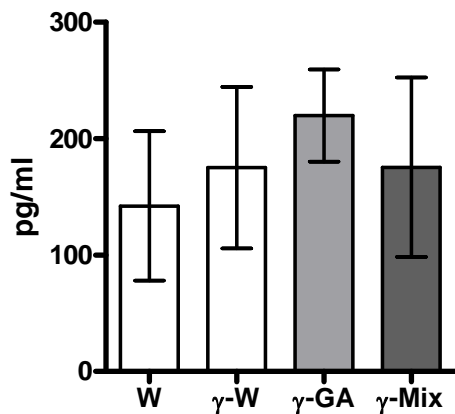
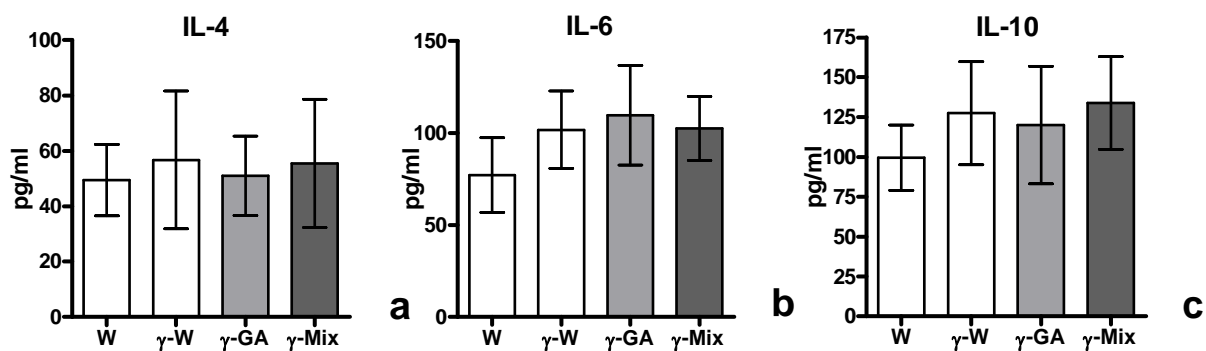


Abbildung 42: Auswirkungen von Gallussäure und einer Kombination von Antioxidantien auf IFN- γ -Konzentrationen im Plasma bestrahlter Ratten. Die Ratten wurden wie in Abb. 17 (S. 41) beschrieben behandelt. Anschließend wurde eine Kontroll-, die Gallussäure- und die Kombinations-Gruppe bestrahlt, getötet, das Blut gesammelt und das Plasma mittels Zentrifugation abgetrennt. Der TNF- α -Wert wurde mit einem ELISA-Kit bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte von fünf Tieren pro Gruppe und die jeweiligen Standardabweichungen. W-Wasser, γ -W-Wasser-Gruppe bestrahlt, γ -GA- Gallussäure-Gruppe bestrahlt, γ -Mix- Kombinations-Gruppe bestrahlt.

4.2.4.3. Interleukin 4, Interleukin 6 und Interleukin 10

Wie in den Abbildungen 43 a-c zu erkennen ist, kam es, wie auch bei den anderen immunologischen Parametern, zu geringfügigen, aber nicht signifikanten Änderungen der IL-4-, IL-6- und IL-10-Werte nach Bestrahlung der Tiere. Durch zusätzliche Behandlung der Tiere mit GA bzw. mit dem Antioxidantiengemisch wurden die IL-Konzentrationen nicht beeinflusst.



Abbildungen 43 a-c: Auswirkungen von Gallussäure und einer Kombination von Antioxidantien auf die IL-4-, IL-6- und IL-10-Konzentrationen im Plasma bestrahlter Ratten. Die Ratten wurden wie in Abb. 17 (Seite 41) beschrieben behandelt. Anschließend wurde eine Kontroll-, die Gallussäure und die Kombinations-Gruppe bestrahlt, getötet, das Blut gesammelt und das Plasma mittels Zentrifugation abgetrennt. Der Interleukin-Werte wurde mit einem ELISA-Kit bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte von fünf Tieren pro Gruppe und die jeweiligen Standardabweichungen. W-Wasser, γ -W- Wasser-Gruppe bestrahlt, γ -GA- Gallussäure-Gruppe bestrahlt, γ -Mix- Kombinations-Gruppe bestrahlt.

5. Diskussion und Schlussfolgerungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung von drei Antioxidantien, nämlich Grüntee-Extrakt (Sunphenon), Gallussäure und Vitamin C (Ascorbinsäure), auf die DNA-Stabilität in inneren Organen (Blut, Leber und Kolon) in Experimenten mit Labornagern. Im ersten Abschnitt des Diskussionsanteils werden die Resultate der Einzelzellgelelektrophoresetests diskutiert, im zweiten die Ergebnisse der Messungen der biochemischen Parameter (TEAC und LDL-Oxidation) und im dritten Teil die Messungen der immunologischen Parameter (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 und IL-10). Der letzte Abschnitt enthält die wichtigsten Schlussfolgerungen.

In den SCGE Tests wurde in einigen Experimenten eine Abnahme der DNA-Schäden in Lymphozyten, Hepatozyten und Kolonozyten beobachtet, im Gegensatz dazu wurden keine Änderungen der biochemischen und immunologischen Parameter im Plasma gemessen.

Die Frage, ob zwischen einzelnen Biomarkern für oxidativen Stress und Endpunkten von DNA-Schäden ein Zusammenhang besteht, wird in einer Übersichtsarbeit von Dotan et al. [208] ausführlich diskutiert. Nach Analyse von über 50 Studien kommen sie zu dem Schluss, dass zwischen Messgrößen der Lipid-Peroxidation (wie Malondialdehyd, Lipid Wasserstoffperoxide, Isoprostane) Korrelationen bestehen, nicht aber zwischen dieser Gruppe und anderen Parametern für oxidativen Stress wie der TAC und DNA-Migration (SCGE-Tests). In früheren Studien mit zwei Säften, die Cyanidin Glykoside oder EGCG enthielten wurde eine signifikante Abnahme der Endo III spezifischen Läsionen mit dem Comet Assay, aber keine Änderungen anderer Messgrößen des oxidativen Status (FRAP, TBARs und FOX2) beobachtet [209]. Auch in Untersuchungen mit Olivenöl wurde eine Reduktion der oxidativen DNA-Schäden in Lymphozyten, nicht aber eine Zunahme der TAC im Plasma festgestellt [210].

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie nicht unter allen Testbedingungen der SCGE-Experimente (Standard-Bedingungen, Endo III und FPG) eine Abnahme der DNA-Schäden gefunden wurde, entspricht den Ergebnissen früherer Humanstudien mit verschiedenen Nahrungsfaktoren. Nur in wenigen Fällen wurden Überschneidungen der verschiedenen Endpunkte beobachtet; in etwa 10 % der Studien wurden unter allen Testbedingungen signifikante Effekte festgestellt [150].

5.1. Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophoresetests

5.1.1. Basiswerte in unbestrahlten und γ -bestrahlten Tieren

Der Einzelzellgelelektrophoresetest (SCGE-Test) hat sich in den letzten Jahren zu einer Standard-Methode für die Erfassung von DNA-Schäden entwickelt. Im Vergleich zu anderen Verfahren zeichnet er sich durch eine Reihe von Vorteilen aus, beispielsweise einfache, schnelle und kostengünstige Durchführung, Sensitivität und ein breites Anwendungsspektrum [147].

Das Ausmaß der **DNA-Migration** der Lymphozyten und Hepatozyten im elektrischen Feld, das in der vorliegenden Arbeit in unbestrahlten Tieren gefunden wurde, entspricht den Ergebnissen früherer Studien [211-213]. In den Darmzellen wurden durchwegs höhere Werte der % Tail-Intensitäten gemessen werden als in den anderen untersuchten Organen, auch diese Beobachtung deckt sich mit den Resultaten früherer Experimente [207,214].

Sowohl in den Versuchen mit unbestrahlten Tieren als auch in den Experimenten mit bestrahlten Tieren wurde eine Zunahme der DNA-Migration nach Behandlung der Zellen mit den **läsionsspezifischen Enzymen Endo III und FPG** festgestellt, dies zeigt, dass die verwendeten Enzyme funktionstüchtig waren.

Vor Beginn der Durchführung der Experimente mit bestrahlten Tieren wurde in **Kalibrationsexperimenten** die geeignete Strahlendosis ermittelt. Es wurden vier Dosierungen, nämlich 7.0 Gy, 14 Gy, 22 Gy und 30 Gy, getestet (siehe Abbildung 36 a-c, Seite 66). Wie bereits von anderen Autoren berichtet wurde [215], waren die Lymphozyten besonders empfindlich gegenüber der Induktion von DNA-Schäden durch strahleninduzierten oxidativen Stress. Da in den Colonozyten erst mit der höchsten Dosis (30 Gy) eine deutliche Zunahme der DNA-Migration gefunden wurde, wurde diese in allen nachfolgenden Experimenten eingesetzt.

Die **γ -Bestrahlung** der Tiere führte in allen Organen und unter allen Versuchsbedingungen zu einem deutlichen Anstieg der DNA-Schäden. In den Lymphozyten betrugen die Tail-Intensitäten etwa das 15-fache, in Hepatozyten das 5-fache und in Colonozyten das 1,5-fache der Werte, die in unbehandelten Tieren (Kontrollgruppe) gefunden wurden. Die Strahlendosis, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, ist wesentlich höher als jene,

die in früheren SCGE-Studien [107,199,202] verwendet wurde. Es ist jedoch erwähnenswert, dass diese Experimente mit Mäusen und nicht Ratten durchgeführt wurden.

5.1.2. Auswirkungen von Grüntee-Extrakt auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten

Die Verabreichung von 1,3 mg Grüntee-Extrakt (GTE)/kg (dies entspricht einer Tasse Grüntee beim Menschen) über einen Zeitraum von fünf Tagen hatte keine Auswirkungen auf die DNA-Migration in Blut-, Leber- und Colonzellen (siehe Abbildungen 22 a-i, Seite 52). Nach Gabe der fünffachen Menge kam es zu einer deutlichen Abnahme der DNA-Schäden in Lymphozyten, auch in Hepatozyten und Colonozyten wurden statistisch signifikante, wenn auch schwächere Effekte beobachtet (siehe Abbildung 23, Seite 53).

In früheren Studien postulierte man, dass die niedrigste effektive Dosis von EGCG (dem Hauptinhaltsstoff von GTE), bei der in Labornagern krebsschutz Effekte gefunden wurden, dem Konsum von 4 Tassen Grüntee beim Menschen entspricht [216]. In Interventionsstudien, in denen die Auswirkung von Grüntee (GT) auf oxidative DNA-Schäden (DNA-Strangbrüche und 8-Oxo-dG) untersucht wurde, wurde in den meisten Fällen eine Reduktion der DNA-Schäden festgestellt; es wurden dabei Dosierungen von zwei bis zehn Tassen GT über einen Zeitraum von einer Woche bis zu drei Monaten eingesetzt [78-80,83,84]. Vergleiche der Humanstudien mit Tierstudien sind in den meisten Fällen nicht aussagekräftig, da zumeist sehr hohe Konzentrationen von GT verabreicht wurden (bis zu 20 Tassen pro Tag beim Menschen entsprechend) und oxidativer Stress durch die Gabe von Chemikalien ausgelöst wurde [85-90].

Neben einer großen Anzahl von Human- und Tierstudien wurden auch *In-vitro*-Untersuchungen mit GT und dessen Hauptinhaltsstoff, EGCG, durchgeführt. In den meisten Experimenten wurden mit mikro- und millimolaren EGCG Konzentrationen antioxidative Wirkungen gefunden (für Übersichtsarbeit siehe Frei und Higdon, 2003 [217]).

In einer *In-vitro*-Studie mit diversen GT-Catechinen (ECG, EGC, EGCG, Epicatechin und Catechin) wurde eine Abnahme der DNA-Einzelstrangbrüche und eine Reduktion der oxidierten Purine und Pyrimidine in einem Plasmid-DNA-Test untersucht, dabei erwies sich EGCG als die wirksamste Verbindung [218]. In einem Experiment mit peripheren humanen Leukozyten reduzierte EGCG die Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen und oxidierten

Pyrimidinen (Endo III) durch Bleomycin [219]. Sinha et al. [220] fanden eine Reduktion Arsen-induzierter DNA Schäden in humanen Lymphozyten. In diversen anderen Testsystemen wie dem Mikronukleus- und dem Salmonella/Mikrosomentest wurden antimutagene Wirkungen der GT-Polyphenole nachgewiesen [221,222].

In der Literatur finden sich allerdings auch Hinweise auf toxische Eigenschaften der GT-Polyphenole, beispielsweise auf die Auslösung von oxidativem Stress und von DNA Schäden, Peroxidation von Fettsäuren und Bildung von Wasserstoffperoxid [223-228]. Beispielsweise fanden Elbling et al. [229] in einer Studie mit humanen Zellkulturen eine Zunahme von oxidativem Stress und DNA-Schäden bei EGCG-Konzentrationen im Bereich zwischen 10 und 20 μM . Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Behandlung von frisch isolierten humanen Lymphozyten mit EGCG erhalten [229]. Allerdings ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert, dass die nach GT-Konsum erreichbaren physiologischen Konzentrationen im nanomolaren Bereich liegen [230].

Die Aussagekraft von *In-vitro*-Studien ist begrenzt, da sie die Absorption und Verstoffwechselung im Körper nicht reflektieren. Nach Aufnahme werden die Catechine im Dünndarm, in der Leber und der Niere verstoffwechselt [217]. Die Stoffwechselprodukte besitzen andere antioxidative Eigenschaften als die Ausgangssubstanzen [231]. Darüber hinaus wurden nur in wenigen *In-vitro*-Studien physiologisch relevante Konzentrationen von GT Polyphenolen eingesetzt [217].

5.1.3. Auswirkungen von Gallussäure auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten

Gallussäure (GA) war bereits bei einer sehr niedrigen Dosierung wirksam. Verabreichung von 0,2 mg/kg führte zu einer Reduktion der DNA-Migration in Blutzellen mit dem läsionsspezifischen Enzym Endo III (45%). Darüber hinaus wurden auch protektive Wirkungen in den Dickdarmzellen beobachtet (siehe Abbildungen 24 a-i, Seite 54) Diese Effekte waren nicht überraschend, da auch in einer früheren Humanstudie und auch in einem Tierexperiment mit GA eine Reduktion der DNA-Migration beobachtet worden war [11].

Die positive Auswirkung der GA auf die DNA-Stabilität in den Lymphozyten und in den Colonozyten konnte auch in den Bestrahlungsexperimenten bestätigt werden (siehe

Abbildungen 37 a-i, Seite 67), darüber hinaus wurde unter dieser Versuchsbedingung auch eine Abnahme der DNA-Schäden in den Leberzellen beobachtet. Zusätzlich kam es auch zu einer Reduktion der Einzel- und Doppelstrangbrüche (Standardbedingungen des SCGE-Tests). In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass in einigen Studien nachgewiesen wurde, dass Antioxidantien bei erhöhter oxidativer Belastung (die auch durch ionisierende Strahlung ausgelöst wird) bessere Wirkungen zeigen. Beispielsweise wurde bei Intervention mit Cruziferen in Rauchern stärkere Effekte beobachtet [232]; auch in einer Interventionsstudie, in der von den Probanden mit Antioxidantien angereichertes Brot konsumiert wurde, konnte eine Reduktion der DNA-Schäden in Lymphozyten bei Rauchern, nicht aber bei Nichtrauchern festgestellt werden [233].

Abgesehen von der Studie von Ferk et al. [11] wurde bisher nur eine weitere *In-vivo*-Untersuchung mit GA publiziert. In dieser wurde Mäusen eine einmalige hohe Dosis GA (80 mg/kg KG) unmittelbar vor einer γ -Bestrahlung subcutan verabreicht, auch unter diesen Bedingungen wurde in SCGE-Tests eine Reduktion der DNA-Strangbrüche detektiert [107].

Neben den wenigen *In-vivo*-Studien mit GA existieren auch mehrere *In-vitro*-Experimente, in denen die Auswirkungen der Säure auf die DNA-Stabilität und ihre antimutagenen Eigenschaften untersucht wurden. Beispielsweise konnte in Experimenten mit humanen Lymphozyten durch 3-Amino-1-Methyl-5*H*-Pyrido[4,3-*b*]indol (Trp-P-2), 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) (Trp-P-2 und PhIP sind mutagene heterozyklische aromatische Amine, die sie sich bei der thermischen Zubereitung von Fleisch bilden können) und Wasserstoffperoxid induzierte DNA-Einzelstrangbrüche durch Inkubation mit GA verringert werden [108]. Auch die durch Wasserstoffperoxid induzierte Bildung oxidierten Pyrimidine (Endo III) wurde durch GA reduziert. Bei einer zehnfach erhöhten GA-Konzentration (600 μ M) kam es allerdings zu einer Induktion von Einzelstrangbrüchen. In derselben Studie wird auch eine Abnahme der Mutagenität von PhIP in Salmonella/Mikrosomentests beschrieben [108].

In weiteren SCGE-Experimenten mit humanen Leukemielymphoblastenlinien wurden keine DNA-schädigenden Wirkungen von GA (1,2 mM) festgestellt; die Substanz reduzierte die durch Wasserstoffperoxid induzierten DNA-Einzelstrangbrüche (ca. 1,2 mM) [234]. In einem *In-vitro*-Modell mit humanen Lymphozyten, in denen DNA-Migration ebenfalls durch

Wasserstoffperoxid ausgelöst wurde, führte Inkubation mit sehr niedrigen GA-Konzentrationen (30 bis 360 nM) zu einer signifikanten Reduktion der DNA-Migration der DNA [235].

5.1.4. Auswirkungen von Vitamin C auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten

Verabreichung von Vitamin C (VC) in einer Dosis von 1,3 mg/kg (entsprechend den DACH-Referenzwerten für Menschen) führte zu keinen DNA-protectiven Effekten (siehe Abbildungen 25 a-i, Seite 55). Die Tail-Intensität war in den Colonozyten nach Behandlung mit FPG (-27 %) reduziert, allerdings war dieser Effekt statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu kam es nach Behandlung mit FPG in den Lymphozyten zu einer signifikanten Zunahme der DNA-Migration. Nach Verabreichung der fünffachen Dosis VC (6,7 mg/kg) ergab sich ein ähnliches Bild: Wiederum kam es zu einer Zunahme der DNA-Schäden in den Lymphozyten nach FPG Behandlung, zusätzlich wurden schwache protective Effekte in Hepatozyten (Endo III) und Colonozyten (FPG) beobachtet (Abbildungen 26 a-i, Seite 56).

Die Ergebnisse humaner Interventionsstudien mit VC sind widersprüchlich, in den meisten Untersuchungen konnten keine DNA-protectiven Eigenschaften in Blutzellen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4, Seite 23-24. Panayiotidis et al. [121] fanden nach einmaliger Gabe von 1 g VC sowohl eine Reduktion der endogenen Strangbrüche als auch der Strangbrüche nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid; in einer anderen Studie, in der dieselbe Dosierung VC über einen Zeitraum von sechs Wochen verabreicht wurde, stellte man eine Reduktion der DNA-Schäden nach H₂O₂-Behandlung, nicht aber der endogenen Strangbrüche fest [134]. Anderson et al. [122] beobachteten nach zweiwöchiger Intervention mit VC weder nach Verabreichung von 60 mg noch nach Gabe von 6 g pro Tag eine Veränderung der DNA-Stabilität.

Auch in Tierstudien mit VC wurden meist keine DNA-protectiven Effekte gefunden. Franke und Mitautoren [137] beobachteten in Experimenten mit Mäusen nach einmaliger Gabe von 30 mg VC/kg KG eine Zunahme der DNA-Schäden in peripheren weißen Blutzellen; mit einer niedrigeren Dosis (1 mg VC/kg KG) wurden keine Effekte gefunden.

In einer Reihe von *In-vitro*-Studien fand man, dass VC DNA-Schäden auslöst [118]. Diese pro-oxidativen Effekte sind auf die Reduktion von Fe (III) zu Fe (II) und von Cu (III) zu Cu (II) zurückzuführen [110]. Die auf diese Weise reduzierten Übergangsmetalle reagieren

mit molekularem Sauerstoff und reduzieren diesen zum Superoxidradikal, aus dem in einem weiteren Reaktionsschritt Wasserstoffperoxid und Sauerstoff entstehen. Wasserstoffperoxid spielt möglicherweise bei der hemmenden Wirkungen von VC auf die Entstehung von Tumoren eine Schlüsselrolle [236]. Auch zytotoxische Wirkungen von VC, wie die Auslösung der Apoptose (programmierter Zelltod), wurden in zahlreichen Studien mit Zellkulturen nachgewiesen [237-239]. Es ist erwähnenswert, dass in vielen *In-vitro*-Studien millimolare Konzentrationen von Ascorbinsäure verwendet wurden [116,237,239] während die *in vivo* durch normale Ernährung oder auch durch Supplemente erreichbaren Konzentrationen den mikromolaren Bereich nicht überschreiten [240].

5.1.5. Auswirkungen verschiedener Kombinationen der Antioxidantien auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten, Hepatozyten und Colonozyten

Die Kombination von GTE (1,3 mg/kg), GA (0,2 mg/kg) und VC (6,7 mg/kg) führte in allen untersuchten Organen zu einer Reduktion der DNA-Schäden. Nach Verabreichung dieser Mischung wurden ähnliche Effekte gefunden wie nach Behandlung der Tiere mit GA. Die stärksten Effekte wurden in den Lymphozyten beobachtet (-50 % Tail-Intensität nach Behandlung mit Endo III), in Colonozyten wurde nach Behandlung mit beiden läsion-spezifischen Enzymen eine Abnahme der DNA-Schädigung gefunden. In Hepatozyten waren diese Effekte nur schwach (siehe Abbildungen 27 a-i, Seite 57).

Die Ergebnisse der SCGE-Tests nach Behandlung der bestrahlten Tiere lagen in einem ähnlichen Bereich wie die Resultate der Experimente mit den unbehandelten Labornagern, allerdings war die DNA-protective Wirkung schwächer als nach Behandlung mit Gallussäure, beispielsweise wurde in keinem der untersuchten Organe eine Reduktion der oxidierten Purine (FPG) festgestellt (siehe Abbildungen 38 a-i, Seite 68). Es ist erwähnenswert, dass in den bestrahlten Tieren unter Standardbedingungen eine Reduktion der Einzel- und Doppelstrangbrüche gefunden wurde.

Verabreichung eines Gemisches von GA (0,2 mg/kg) und VC (6,7 mg/kg) führte zu keiner Reduktion der Tail-Intensitäten in den Lymphozyten, in den Leberzellen kam es zu einer schwachen Abnahme der DNA-Migration mit FPG (siehe Abbildungen 28 a-f, Seite 58). Im Gegensatz dazu wurden mit einer Kombination von GA (0,2 mg/kg) und GTE (1,3 mg/kg) in allen drei Organen deutliche protective Effekte gefunden (siehe Abbildungen 29 a-i, Seite

59). In den Lymphozyten kam es mit beiden läsionsspezifischen Enzymen zu einer Reduktion der DNA-Schäden, in den Colonozyten wurden zusätzlich auch unter Standardbedingungen protektive Effekte detektiert. Auch in Hepatozyten wurde nach Behandlung mit FPG eine Abnahme der DNA-Migration gefunden.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Reduktion der DNA-Schäden nach Verabreichung der Kombination aller drei Antioxidantien ausschließlich auf die GA zurückzuführen ist und die Mischung der GA mit den anderen Substanzen zu einer Reduktion ihrer antioxidativen Wirksamkeit führt. Kombination der GA mit VC führt zu einer Abschwächung der Effekte, eine Kombination mit GTE beeinträchtigte die antioxidativen Wirkungen der GA nicht.

5.2. Ergebnisse der Messungen der biochemischen Parameter

In der vorliegenden Studie wurden als Nebemessgrößen die gesamte antioxidative Kapazität (TEAC) und die Oxidation der Lipoproteine niedriger Dichte (LDL-Oxidation) im Plasma der Ratten bestimmt. Die TEAC ermöglicht Aussagen über die kumulative Wirkung aller Antioxidantien im Plasma, zu denen endogen gebildete Moleküle wie Bilirubin und Harnsäure, sowie die Vitamine C und E und andere, aus der Nahrung aufgenommene, antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe zählen [156].

Einer der Vorteile des TEAC Assays besteht darin, dass die Messungen in einem breiten pH-Bereich durchgeführt werden können und diese Methode sowohl für die Untersuchung von hydro- als auch lipophilem Probenmaterial herangezogen werden kann. Ein Nachteil des Tests ist, dass das für die Reaktion benötigte ABTS-Radikal unter physiologischen Bedingungen nicht vorkommt. Ein weiteres Problem stellt die Dauer der Messungen dar. Die Absorption wird üblicherweise nach 6 min abgelesen, auf diese Weise werden Reaktionen, die länger dauern, nicht erfasst [241].

Erhöhte Plasmawerte von oxidiertem LDL sind ein Risikofaktor für das Auftreten von koronaren Herzerkrankungen [242,243], aus diesem Grund wird seit einiger Zeit nach Substanzen gesucht, die die Oxidation der LDL verzögern und vor Atherogenese schützen. Man konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisen, dass eine Reihe von

Nahrungsinhaltsstoffen die LDL-Oxidation verhindern; beispielsweise reduzieren Lebensmittel, die reich an Flavonoiden sind, wie Ingwer, Soja Extrakt, Granatapfel und Olivenöl, die LDL-Oxidation [244].

5.2.1. Ergebnisse der TEAC-Messungen im Plasma

Wie im Ergebnisteil beschrieben wurde, wurden weder Auswirkungen der drei Antioxidantien auf die TEAC-Werte im Plasma unbehandelter Tiere (siehe Abbildungen 30 a-d, Seite 60), noch im Plasma bestrahlter Tiere (siehe Abbildung 39, Seite 69) beobachtet. Tabelle 8 gibt einen Überblick über frühere Studien, in denen die Auswirkung von GT und VC auf die gesamte antioxidative Kapazität im Plasma gemessen wurde.

Tabelle 8: Änderungen der gesamten antioxidativen Kapazität (TAC) durch Verabreichung von Grüntee und Vitamin C in Humanstudien¹

Studiendesign	Dosierung	Dauer	Effekt	Ref.
Grüntee				
GTE, n=20 sequentielle Studie (Proben- entnahme 1-24 h nach Konsum)	4x 145 mg EGCG 4x 256 mg GTE	1x	↔ TAC im Plasma (TEAC)	[245]
n=12 ♂ sequentielle Studie	4x150 ml/d	28 T	↔ TAC im Plasma (TEAC)	[246]
n=10 sequentielle Studie, Messung vor GT Konsum, nach 60 min (1) und nach 120 min (2)	150 ml 300 ml 450 ml	1x	↔ TAC im Plasma nach 150ml (TEAC) ↑ TAC im Plasma nach 300ml und 450ml (1 und 2) (TEAC)	[247]
n=25 Dyslipidemische Patienten, Parallel design mit Kontrolle	3 g auf 500 ml Wasser/T	90 T	↑ TAC im Plasma (TRAP)	[248]
n=7, nach GT Konsum Bankdrücken, Parallel design mit Kontrolle	2 g auf 200ml Wasser, 3x/T	7 T	↑ TAC im Plasma (FRAP)	[249]
n=16 (NR) Parallel design mit Kontrolle	900 ml	28 T	↑ TAC im Plasma (TEAC)	[250]
GTE, n=16 ♂ (8R,8NR), Crossover Studie mit Kontrolle	200 mg GTE/T	21 T	↑ TAC im Plasma der R (TEAC)	[82]
n=12 ♀ (NR) Parallel design mit Kontrolle	2 Tassen GT/T (160 mg GTE/Tasse)	42 T	↑ TAC im Plasma (TEAC)	[78]

Fortsetzung Tabelle 8

Studiendesign	Dosierung	Dauer	Effekt	Ref.
Vitamin C				
n=12 (NR) VC angereicherter Tomatensaft (1) vs normaler Tomatensaft (2), Paralleldesign	435 mg VC/T (1) 45,5 mg VC/T (2)	14 T	↑ TAC im Urin (TEAC und FRAP) ↔ TAC im Plasma (TEAC und FRAP)	[251]
n=10 (NR), VC 2 h vor körperlicher Aktivität bis zur Erschöpfung, sequentielle Studie	2x500 mg	1x	↑ TAC im Plasma (TEAC)	[252]
n=48 (NR), Probanden mit niedrigen und hohen Cholesterinwerten, Crossover Studie mit Placebo	60 mg/T 6000 mg/T	14 T	↑ TAC im Plasma (ABTS Radikal)	[122]

1 Abkürzung: **ABTS** - 2,2'-Azinobis-3-Ethylbenzo-thiazolin-6-Sulfonsäure, **EGCG** – Epigallocatechin-3-gallat, **FRAP** – „Ferric Iron Reducing Antioxidant Parameter“, **H** - Menschen, **n** = Anzahl Studienteilnehmer pro Behandlungsgruppe, bzw. Gesamtanzahl der Studienteilnehmer bei Crossover Studien, **NR** = Nicht-Raucher, **ORAC** – „Oxygen Radical Absorbance Capacity test“, **R** = Raucher, **Ref.-** Referenzen, **T-** Tage, **Ta-** Tassen **TAC** - Gesamte antioxidative Kapazität, **TEAC** - Trolox Äquivalent Assay, ↑ signifikante Zunahme ($p < 0,05$) ↓ signifikante Abnahme ($p < 0,05$), ↔ keine Änderungen

Es ist schwierig, diese Untersuchungen mit den vorliegenden Tierexperimenten zu vergleichen, da der Grüntee meist entweder nur einmalig oder über einen Zeitraum von mehreren Wochen verabreicht wurde. Sung et al. fanden [247] nach einmaliger Gabe von 450 ml und 300 ml GT, nicht aber nach Verabreichung von 150 ml (entspricht einer Tasse) eine Zunahme der TAC im Plasma. Im Gegensatz dazu stellten dieselben Autoren in einer späteren Studie nach vierwöchiger Verabreichung von 4 Tassen pro Tag keine Änderung der TAC-Werte fest [246].

Mit GA wurde nur eine Tierstudie gefunden, die aufgrund der hohen Dosierung (100 mg/kg) über einen Zeitraum von zwei Wochen [253] nicht mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar ist. Der TEAC Wert in Herzgewebe war nach der Intervention deutlich (54 %) erhöht.

In einer Humanstudie, in der mit VC angereicherter Tomatensaft (435 mg VC/T) über einen Zeitraum von zwei Wochen verabreicht wurde, wurde eine Zunahme der TAC im Urin, nicht aber im Plasma detektiert [251]. Anderson et al. [122] fanden sowohl nach Gabe von 60 mg, als auch nach 6 g VC eine Zunahme (12 % und 10 %) des Werts im Plasma.

5.2.2. Ergebnisse der Messungen der LDL-Oxidation im Plasma

Weder die drei Antioxidantien noch deren Kombination hatten in der vorliegenden Studie Auswirkungen auf die LDL-Oxidation im Plasma (siehe Abbildungen 31 a-d, Seite 61 und Abbildung 40, Seite 69). Die Ergebnisse von Humanstudien mit GT und VC und dessen Auswirkung auf die LDL-Oxidation im Plasma sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Effekte der Verabreichung von Grüntee und Vitamin C auf die LDL-Oxidation in Humanstudien¹

Studiendesign	Dosierung	Dauer	Effekt	Ref.
Grüntee				
n=16 (NR) Paralleldesign mit Kontrolle	900 ml/T	28 T	↔ LDL-Oxidation	[250]
n=13 (R) Paralleldesign mit Placebo	900 ml (6 Ta.) 3600 mg GTP (18 Ta.)	28 T	↔ LDL-Oxidation	[254]
n=20 ♂ (NR), sequentielle Studie	4 Ta.	1 x	↔ LDL-Oxidation	[255]
n=10, sequentielle Studie	5000 mg GT Pulver	1 x	↔ LDL-Oxidation	[256]
n=12 ♂, sequentielle Studie	4x150 ml/T	28 T	↓ LDL-Oxidation	[246]
n=20 ♂ (R), sequentielle Studie	600 ml/T	28 T	↓ LDL-Oxidation	[257]
n=11 (R, NR) Paralleldesign mit Kontrolle	500 mg Catechin (=6-7 Ta.)	28 T	↓ LDL-Oxidation	[258]
n=11 ♂ (R, NR) Paralleldesign mit Kontrolle	2x 300 mg GTP/T (=6-8 Ta.)	7 T	↓ LDL-Oxidation	[259]
Vitamin C				
n=19 ♂ (R), Paralleldesign mit Placebo	2x250 mg/T	60 T	↔ LDL-Oxidation	[260]
n=8 ♂ (R), Crossover Studie mit Placebo	1000 mg/T	14 T	↔ LDL-Oxidation	[261]
n=9 (NR), Paralleldesign mit Kontrolle	2x500 mg/T	28 T	↔ LDL-Oxidation	[262]
n=14 (NR), Patienten mit DM II Paralleldesign mit Placebo	500 mg/T	28 T	↔ LDL-Oxidation	[263]
n=20, Patienten mit DM II, Crossover Studie mit Placebo	3x1000 mg/T	14 T	↔ LDL-Oxidation	[264]
n=9 (R, NR), fettreiche Ernährung, Paralleldesign mit Kontrolle	500 mg/T	60 T	↓ LDL-Oxidation	[265]
n=9 (R), Paralleldesign mit Placebo	2x500 mg/T	28 T	↓ LDL-Oxidation	[266]

1 Abkürzungen: DM II – Diabetes mellitus Typ II, n = Anzahl Studienteilnehmer pro Behandlungsgruppe, bzw. Gesamtanzahl der Studienteilnehmer bei Crossover Studien, NR = Nicht-Raucher, R = Raucher, Ref.-Referenzen, T-Tage, Ta.-Tasse, 1 Tasse = 150ml, ↑ signifikante Zunahme (p<0,05), ↓ signifikante Abnahme (p<0,05), ↔ keine Änderungen

In einer Reihe von Studien wurde keine Änderung dieses Parameters nach Intervention mit GT beobachtet [250,254,255]; in anderen Experimenten kam es zu einer deutlichen Reduktion der Empfindlichkeit der LDL-Partikel gegenüber *ex vivo* Oxidation. Es ist allerdings zu erwähnen, dass in einigen dieser Studien große Mengen an Grüntee (6 bis 8 Tassen) verabreicht wurden [258,259].

In den meisten Humanstudien mit VC wurde keine Reduktion der LDL-Oxidation im Plasma gefunden. Auch im Fall von VC sind Vergleiche aufgrund des unterschiedlichen Designs der Untersuchungen nur bedingt möglich. In den meisten Studien wurde keine Reduktion der LDL-Oxidation beobachtet [260-263]. Upritchard et al. [263] fanden mit einer Menge, die jener der höheren Dosierung in der vorliegenden Studie entspricht (6,7 mg VC/kg), in einer vierwöchigen Studie keine Änderung der LDL-Oxidation, in einer anderen Studie, in der dieselbe Menge über einen Zeitraum von zwei Monaten verabreicht wurde, wurde allerdings eine Abnahme der Empfindlichkeit der LDL-Partikel gegenüber Oxidation beobachtet [265].

Es wurden keine Human- oder Tierstudien gefunden, in denen die Auswirkungen von GA auf die LDL-Oxidation untersucht wurden.

5.3. Ergebnisse der Messungen der immunologischen Parameter

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen der drei Antioxidantien auf die Konzentrationen der Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und Interferon γ (IFN- γ), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-10 (IL-10) Werte in unbestrahlten und γ -bestrahlten Ratten untersucht.

Das Blut der Tiere wurde mittels Dekapitation gewonnen. Dies hatte zur Folge, dass diverse Rückstände (Gewebe, Fell) in die Proben gelangten. Dadurch wurde die Abtrennung des Plasmas durch Zentrifugation erschwert, und es war nicht in allen Fällen möglich, eine ausreichende Menge an Probenmaterial zu gewinnen, um sämtliche Parameter zu messen.

Die Verabreichung der drei Antioxidantien hatte keine Auswirkungen auf die **TNF- α** Werte im Plasma von Ratten (siehe Abbildungen 32 a-d, Seite 62 und Abbildung 41, Seite 70). Nach Bestrahlung der Tiere wurde ein geringfügiger Anstieg dieses Parameters

gefunden, der jedoch statistisch nicht signifikant war. In Humanstudien, in denen 2 g VC pro Tag über einen Zeitraum von vier Wochen bzw. mit 435 mg VC supplementierter Tomatensaft pro Tag über zwei Wochen verabreicht wurden, wurde ebenfalls keine Veränderung der TNF- α Werte im Plasma der Probanden beobachtet [251,267]. Auch in einer Interventionsstudie von de Maat et al. [268], in der die Probanden über einen Zeitraum von 4 Wochen täglich 6 Tassen GT konsumierten, wurde keine Änderung des TNF- α -Wertes im Plasma gefunden. In einer Tierstudie wurde nach Gabe von 2 x 5 mg/kg/T EGCG über zehn Tage hinweg nach Induktion von Hepatitis durch Concanavalin A [269], nicht aber nach Verabreichung einer höheren Dosis (2 x 10 mg/kg EGCG), eine Abnahme des TNF- α beobachtet [270].

Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Ergebnisse früherer Studien, in denen immunologische Parameter nach Verabreichung von GT und VC untersucht wurden.

Tabelle 10: Effekte der Verabreichung von Grüntee-Extrakt und Vitamin C auf immunologische Parameter (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 und IL-10)

	Studiendesign	Dosis	Dauer	Ergebnisse	Ref.
Grüntee					
H	n=13 (R) Paralleldesign mit Placebo	500 mg GTE auf 150 ml Wasser 6 x /T	28 T	↔ TNF- α (Plasma) ↔ IL-6 (Plasma)	[268]
Rt	n=10 Leberschäden durch LPS	30 oder 35 g GTE/kg Futter	14 T	↔ TNF- α (Plasma) ↓ IFN- γ (Plasma) ↓ IL-4, ↓ IL-6, ↓ IL-10 (Plasma)	[271]
M	n=4 GTE (ip) zusammen mit SEB	50 μ g GTE	1 x	↓ TNF- α (Serum) ↓ IFN- γ (Serum) ↓ IL-4 (Serum)	[272]
M	n=4, nach Verabreichung von EGCG (mittels Schlundsonde) Auslösung von Hepatitis (ConA)	5 mg EGCG/kg KG 2x/T	10 T	↓ TNF- α (Plasma) ↓ IFN- γ (Plasma)	[269]
M	n=4-6 EGCG ip nach Auslösung von Colitis (TNBS)	10 mg EGCG/kg KG 2 x /T	1, 3 od. 7 T	↔ TNF- α (Plasma) ↔ IL-6, ↔ IL-10 (Plasma)	[270]

Forsetzung Tabelle 9

	Studiendesign	Dosis	Dauer	Ergebnisse	Ref.
Vitamin C					
H	n=8 (NR) Patienten mit DM, Paralleldesign mit Placebo	2000 mg/T	28 T	↔ TNF-α (Serum) ↔ IL-6 (Serum)	[267]
H	n=13, VC 7 T vor Marathon, Paralleldesign mit Placebo	1500 mg/T	7 T	↔ IFN-γ (Plasma) ↔ IL-6 , ↔ IL-10 , (Plasma)	[273]
H	n=20, Patienten mit DM II, Crossover Studie mit Placebo	3 x 1000 mg/T	14 T	↔ IL-6 (Plasma)	[264]
H	n=12 (NR), VC angereicherter Tomatensaft (1) vs normaler Tomatensaft (2), Paralleldesign	435 mg (1) 45,5 mg (2)	14 T	↔ TNF-α (Plasma)	[251]
H	n=7, VC 7 T vor Marathon, am Tag des Rennens und 2T danach, Paralleldesign mit Placebo	500 mg/T 1500 mg/T	10 T	↓ IL-10 (Plasma) bei 1500mg VC	[274]
M	n=15, nach 4 w VC: Sensibilisiert mit DNCB	2500 mg/kg Futter	56 T	↔ TNF-α im Überstand LPS stimulierter Milzzellen, ↔ IFN-γ , IL-4 im Überstand Conavalin A stimulierter Kulturen aurikulärer Lymphknoten und Milzzellen	[275]

1 Abkürzungen: ConA- Concanavalin A, **DM II** – Diabetes Mellitus Typ II, **DNCB** – Dinitro-Chloro-Benzen, **EGCG** – Epigallocatechingallat, **H** – Menschen, **LPS**-Lipopolysaccharid, **M**- Mäuse, **n** = Anzahl Studien-teilnehmer/Tiere pro Behandlungsgruppe, bzw. Gesamtanzahl der Studienteilnehmer bei Crossover Studien, **NR** = Nicht-Raucher, **R** = Raucher, **Rt** – Ratten, **SEB**- Superantigen Staphylokokkus Enterotoxin B, **T**-Tag, **TNBS**- 2,4,6-Trinitrobenzen-sulfonsäure, ↑ signifikante Zunahme (p<0,05), ↓ signifikante Abnahme (p<0,05) , ↔ keine Änderungen

Die **IFN-γ**-Werte im Plasma der Tiere wurden durch die Antioxidantien ebenfalls nicht signifikant verändert (siehe Abbildungen 33 a-c Seite 63 und Abbildung 42, Seite 71). Nach Bestrahlung der Tiere kam es allerdings zu einer nicht signifikanten Zunahme dieses Parameters (Anstieg um 23 %). Im Gegensatz dazu wurde in früheren Studien mit Labornagern eine Abnahme der IFN-γ Werte nach Gabe von Grüntee-Extrakt bzw. EGCG gefunden. He et al. [271] verabreichten Ratten 35 g EGCG pro kg Futter (entspricht einer ähnlichen Menge wie in der vorliegenden Studie), sie fanden nach zwei Wochen eine Reduktion der IFN-γ-Werte; in einer anderen Studie [269] wurde Mäusen zweimal pro Tag 5 mg/kg EGCG über zehn Tage hinweg verabreicht. Dies führte neben der Reduktion des TNF-α-Wertes auch zu einer Abnahme der IFN-γ-Konzentrationen.

In den meisten Tier- und Humanstudien mit Vitamin C wurde wie in der vorliegenden Studie keine Änderung des IFN- γ -Wertes im Plasma gefunden. In einer Studie, in der Mäusen 2500 mg VC pro kg Futter vier Wochen verabreicht wurde, wurde keine Änderung dieses Parameters in Lymphknoten und Milzzellkulturen beobachtet [275]. Auch im Plasma von Marathonläufern, die sieben Tage vor einem Rennen 1500 mg VC/Tag konsumiert hatten, wurde kein Effekt detektiert [273].

Wie erwähnt, war nicht in allen Fällen ausreichend Plasma vorhanden, um die Konzentrationen aller drei **Interleukine** zu messen; IL-6 konnte in den Experimenten mit den unbestrahlten Tieren nicht bestimmt werden, auch die IL-10 Konzentrationen konnten in der Gruppe, die mit GA behandelt worden war, nicht ermittelt werden.

Wie in den Abbildungen 34 a-d (Seite 64), 35 a-c (Seite 65) und 43 a-c (Seite 71) dargestellt, führten weder die einzelnen Antioxidantien, noch deren Kombination zu einer Veränderung der Interleukin-Konzentrationen (IL-4, IL-6 und IL-10). Auch nach Bestrahlung der Tiere war nur eine geringfügige Zunahme (um 15 % - 32 %) der Plasmakonzentrationen zu beobachten (Abbildungen 42 a-c, Seite 71). Dies liegt möglicherweise daran, dass die Tiere unmittelbar nach der Bestrahlung getötet wurden. Die Ergebnisse früherer Studien sind nur schwer mit der vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Mit GT wurden einige Tierstudien gefunden, allerdings wurden in diesen Entzündungsreaktionen durch Chemikalien ausgelöst (siehe Tabelle 9, Seite 84). IL-6- und IL-10-Konzentrationen im Plasma wurden nach Verabreichung von VC in Humanstudien untersucht, auch in diesem Fall ist es problematisch, Vergleiche zu ziehen. In zwei Studien wurde Diabetes Mellitus Typ II Patienten jeweils 2 g VC bzw. 3 g VC pro Tag über einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen verabreicht. Dies führte zu keiner Änderung der IL-6-Konzentrationen im Plasma [264,267]. Nach Verabreichung von 1,5 g VC (aber nicht von 500 mg VC) pro Tag über einen Zeitraum von sieben Tagen vor einem Marathon und zwei weitere Tage danach wurde eine Abnahme der IL-10-Werte im Plasma festgestellt [274]. In einer ähnlichen Studie, in der dieselbe Dosis für sieben Tage vor dem Rennen verabreicht worden war, wurde keine Abnahme der IL-10- und der IL-6-Konzentrationen detektiert [273].

5.4. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen der Verabreichung von drei Antioxidantien, nämlich von Grüntee-Extrakt (GTE), von Gallussäure (GA) und von Vitamin C (VC), auf die DNA-Stabilität mittels Einzelzellgelelektrophoresetests in Tierexperimenten bestimmt. Zusätzlich wurden biochemische Parameter (gesamte antioxidative Kapazität und LDL-Oxidation) und eine Reihe immunologischer Parameter (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 und IL-10) im Plasma der Ratten untersucht.

Die fünftägige Verabreichung von 6,7 mg GTE/kg KG/T (einer Menge, die dem Konsum von fünf Tassen GT beim Menschen entspricht) führte zu einer signifikanten Abnahme der DNA-Migration in Lymphozyten, auch in Colonozyten und Hepatozyten konnten schwache Effekte beobachtet werden; die Verabreichung von 1,3 mg GTE/kg KG/T (entsprechend einer Tasse GT pro Tag) bewirkte keine Änderung dieses Parameters. Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten früher Human- und Tierstudien mit GT, in denen ebenfalls Schutzeffekte gefunden wurden.

Nach Verabreichung einer geringen Menge von GA (0,2 mg/kg KG/T) über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg wurden deutliche DNA-protective Wirkungen in Blut- und Dickdarmzellen gefunden; diese Resultate konnten in einem Experiment, in denen die Tiere einer einmaligen γ -Bestrahlung ausgesetzt wurden, bestätigt werden. Zusätzlich wurde unter diesen Versuchsbedingungen eine Abnahme der DNA-Migration in Leberzellen und auch eine Abnahme der Einzel- und Doppelstrangbrüche beobachtet. Die größere Wirksamkeit der GA unter erhöhtem oxidativem Stress deutet darauf hin, dass GA auch bei Menschen mit erhöhten oxidativen Belastungen, die beispielsweise bei diversen Erkrankungen auftreten, zu erhöhten Schutzwirkungen führen könnte.

Die Gabe einer Kombination von GTE (1,3 mg/kg KG/T), GA (0,2 mg/kg KG/T) und VC (6,7 mg/kg KG/T) führte zu ähnlichen Effekten wie die Verabreichung von GA per se. Die Verabreichung dieser Kombination vor γ -Bestrahlung der Tiere führte zu vergleichbaren Ergebnissen, allerdings war in diesem Fall die DNA-protective Wirkung weniger deutlich ausgeprägt als nach der Behandlung mit GA. Die Verabreichung einer binären Kombination aus GA und VC führt zu keiner Reduktion der DNA-Migration in Lymphozyten, in Leberzellen wurden schwache protective Wirkungen gefunden. Die Kombination von GA und GTE hatte

deutliche positive Auswirkungen auf die DNA-Stabilität in allen untersuchten Organen. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass die Reduktion der DNA-Schäden nach Verabreichung der Kombination aller drei Antioxidantien ausschließlich auf der GA beruht.

VC führte, neben schwach DNA-protektiven Effekten in Colonozyten und Hepatozyten, sowohl in der niedrigeren (1,3 mg/kg KG/T, entsprechend den DACH-Referenzwerten für Menschen) als auch in der fünffach höheren Dosierung zu einer Zunahme der oxidierten Purine in Blutzellen.

Weder die biochemischen Endpunkte (gesamte antioxidative Kapazität, LDL-Oxidation) noch die immunologischen Parameter (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 und IL-10) wurden durch die Verabreichung der Antioxidantien signifikant beeinflusst. Um die Auswirkungen von GTE, GA und VC auf diese Messgrößen genauer zu untersuchen, wäre die Verwendung eines Tiermodells, in dem Entzündungen und oxidativer Stress durch Chemikalien induziert werden, besser geeignet; allerdings ist die Relevanz derartiger Versuchsbedingungen für die Bedeutung der Antioxidantien im gesunden Menschen fraglich.

GT zählt zu den am häufigsten konsumierten Getränken weltweit. Mittlerweile konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass GT die menschliche Gesundheit positiv beeinflusst [64]. Dies führte in den letzten Jahren zu einer vermehrten Vermarktung als Nahrungsergänzungsmittel und zur Herstellung GT-haltiger „funktioneller“ Nahrungsmittel. Aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit der Polyphenole müssen relativ hohe Dosierungen eingesetzt werden, um mit GT positive Wirkungen zu beobachten [64]. Sowohl die Ergebnisse epidemiologischer Studien, als auch die Resultate der vorliegenden Studie zeigen, dass Konsum von fünf oder mehr Tassen Grüntee pro Tag erforderlich ist, um Erkrankungen wie Krebs und Koronarerkrankungen zu verhindern [58,276,277].

GA kommt in einer Vielzahl von Nutzpflanzen vor, unter anderem in Erdbeeren [278], Mangos [279] und Rotwein [280], darüber hinaus ist es auch ein Bestandteil von Carob, dem Mehl des Johannisbrotbaums (*Ceratonia siliqua*) [94]. Die Salze der GA werden aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften Fetten und Ölen zugesetzt [281] und finden als Antioxidantien bei der Herstellung von Nahrungsmitteln im südost-asiatischen Raum vermehrte Anwendung [282]. Allerdings wurden nur relative wenige Studien durchgeführt, die die antioxidativen und DNA-protektiven Eigenschaften in Tieren bzw. im Menschen betreffen. Die bereits erwähnten Resultate einer Humanstudie von Ferk [11] und die

Tatsache, dass auch in der vorliegenden Studie mit niedrigen Dosierungen sehr deutliche Effekte gefunden wurden, deuten darauf hin, dass GA als „Superantioxidans“ wirkt und wesentlich stärker ist als vergleichsweise antioxidativ wirkende Vitamine wie VC und Vitamin E.

In der Literatur finden sich relativ viele Untersuchungen bezüglich der positiven Gesundheitseigenschaften von VC, diese stehen jedoch nicht notwendigerweise mit DNA-protektiven Eigenschaften in Zusammenhang. In Humanstudien wurden wie erwähnt pro-oxidative Effekte beobachtet, und auch in Tierexperimenten wurden derartige Phänomene gefunden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass VC nicht nur *in vitro* DNA-Schäden auslösen kann (wie erwähnt, ist das seit längerem bekannt [117,283], sondern auch im Menschen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die DNA-protectiven Effekte vielversprechender Antioxidantien (die auch als Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden), nämlich Grüntee-Extrakt (GTE), Gallussäure (GA) und Vitamin C (VC), in inneren Organen von Ratten (Leber und Dickdarm) sowie in peripheren Blutzellen (Lymphozyten) in Einzelzellgelelektrophoresetests (SCGE-Tests) vergleichend untersucht. Als Endpunkte wurde DNA-Migration in Folge von Einzel- und Doppelstrangbrüchen und die Bildung oxidierten Purine und Pyrimidine (durch Einsatz läsionsspezifischer Enzyme) bestimmt.

Die Substanzen wurden männlichen Ratten (n=5/Gruppe) in humanrelevanten Dosierungen über einen Zeitraum von fünf Tagen hinweg oral mittels Schlundsonde verabreicht (GTE 1,3 mg/kg KG/T und 6,7 mg/kg KG/T; GA 0,2 mg/kg KG/T; VC 1,3 mg/kg KG/T und 6,7 mg/kg KG/T). Die Gabe von 1,3 mg GTE/kg (entspricht dem Konsum einer Tasse Grüntee beim Menschen) löste keine Effekte aus, die fünffache Menge führte jedoch zu einer starken Abnahme der DNA-Schäden in den Blutzellen, in Leber- und Dickdarmzellen wurden schwächere Effekte gefunden. GA wirkte bereits in der niedrigen Dosierung (0,2 mg/kg, ADI-Wert beim Menschen) in Blutzellen und Dickdarmzellen stark protektiv, VC führte in der niedrigeren Dosierung (DACH-Referenzwert) zu keiner Abnahme der Schäden, in der fünffachen Dosierung kam es zu einer leichten Abnahme der oxidierten Purine in Leberzellen, zusätzlich wurde, wie auch mit der niedrigeren Dosierung, eine Zunahme der oxidierten Purine in Blutzellen (um 28 %) gefunden. Eine Kombination aller drei Antioxidantien (1,3 mg GTE/kg KG/T, 0,2 mg GA/kg KG/T und 6,7 mg VC/kg KG/T), löste ähnliche, aber schwächere Wirkungen als GA aus. Dies deutet darauf hin, dass in diesem Fall Reaktionen stattfinden, die die antioxidative Wirksamkeit der GA reduzieren. Eine binäre Mischung von GA (0,2 mg/kg KG/T) und GTE (1,3 mg/kg KG/T) reduzierte DNA-Schäden in allen untersuchten Organen; die Kombination von GA (0,2mg/kg KG/T) und VC (6,7 mg/kg KG/T) hingegen bewirkte lediglich eine leichte Abnahme der oxidierten Purine in den Leberzellen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Tiere nach Behandlung mit GA oder einer Kombination der drei Antioxidantien bestrahlt (^{60}Co Quelle, 30 Gy). Auch in diesen Experimenten wurden die DNA-protectiven Eigenschaften der GA und der Kombination

bestätigt, die im Bestrahlungsexperiment vor allem in den Blutzellen deutlich waren. Es ist erwähnenswert, dass in diesem Experiment zusätzlich zu der Abnahme der oxidierten Basen auch eine Verringerung der DNA-Migration unter Standardbedingungen des SCGE-Tests (ein Parameter für Einzel- und Doppelstrangbrüche) festgestellt wurde.

Als Nebemessgrößen wurde eine Reihe weiterer Parameter im Plasma der Labornager untersucht. Mit keinem der drei Antioxidantien wurde eine Änderung der LDL-Oxidation und der gesamten antioxidativen Kapazität (TEAC, gemessen mit ABTS⁺) detektiert, auch immunologisch relevante Endpunkte (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10) wurden nicht signifikant beeinflusst.

Diese Ergebnisse zeigen, dass GA bereits in niedrigen Dosierungen in inneren Organen und auch in Blutzellen eine wesentlich stärker ausgeprägte Schutzwirkung vor oxidativen DNA-Schäden hat als GTE und VC; weiters lässt sich aus der vorliegenden Studie sowie aus den Ergebnissen früherer Untersuchungen der Schluss ziehen, dass der Konsum von fünf Tassen GT/Tag vor DNA-Schäden schützt während hohe Dosierungen von VC hingegen eher pro- als antioxidative Auswirkungen auf die DNA-Stabilität in Lymphozyten haben.

7. Summary

Aim of the study was a comparison of the DNA-protective effects of green tea extract (GTE), gallic acid (GA) and Vitamin C (VC) in inner organs (liver and colon) and in peripheral blood cells (lymphocytes) of rats in single cell gel electrophoresis (SCGE) assays.

The substances were given orally per gavage to male rats (n=5/group) over a period of five days in concentrations which are relevant for humans (GTE 1,3 mg/kg bw/d and 6,7 mg/kg bw/d; GA 0,2 mg/kg bw/d; VC 1,3 mg/kg bw/d and 6,7 mg/kg bw/d). Application of 1,3mg GTE/kg (according to consumption of one cup of green tea for humans) did not cause any effect, a fivefold concentration leads to a strong decrease of DNA-damage in blood cells. In liver and colon derived cells weak effects were found. GA (0,2mg/kg, ADI for humans) caused significant protection in blood and colon cells. VC did not induce a protective effect in the lower dose (DACH reference value for humans), after administration of a fivefold concentration a moderate decrease of oxidised purines was detected in the liver, additionally, as with the lower concentration, an increase of DNA-migration attributable to oxidised purines in blood cells was observed. A combination of the three antioxidants (1,3 mg GTE, 0,2 mg GA and 3,7 mg VC) caused similar, but slightly less pronounced effects as compared to those seen with GA alone. A binary combination of GA (0,2 mg/kg) and GTE (1,3 mg/kg) reduced DNA damage in all organ investigated, whereas a combination of GA (0,2 mg/kg) and VC (6,7 mg) leads only to a marginal reduction of DNA migration only in liver cells.

In a second experiment, the animals were treated with GA and the combination of the three antioxidants and were subsequently γ -irradiated (^{60}Co , 30 Gy). Also in this trial protective effects of GA and the combination were seen. The most pronounced effects were seen in the blood cells. It is notable that after radiation clear protective effects were also seen under standard SCGE-conditions (which reflect changes due to single- and double-strand breaks).

Additionally, a set of further parameters in the plasma of the rats was investigated, with none of the antioxidants, alterations of the LDL-oxidation and the total antioxidant capacity (TEAC, measured with the ABTS⁺ radical) were seen, also immunological parameters (TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-6 and IL-10) were not significantly altered.

Taken together, the findings of this study indicate that GA provides stronger protection against oxidative DNA damage in inner organs and blood cells than GTE and VC; with green tea, DNA-protective effects were only seen with concentrations that correspond to consumption of five cups per day, high amounts of VC cause rather pro- than antioxidative effects on the DNA stability in peripheral lymphocytes.

8. Literaturverzeichnis

- [1] S. Knasmüller, A. Nersesyan, M. Misik, C. Gerner, W. Mikulits, V. Ehrlich, C. Hoelzl, A. Szakmary and K.H. Wagner, Use of conventional and -omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical overview, *Br J Nutr* 99 E Suppl 1 (2008) ES3-52.
- [2] B.N. Ames, M.K. Shigenaga and T.M. Hagen, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 7915-7922.
- [3] A. Agarwal, K. Makker and R. Sharma, Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update, *Am J Reprod Immunol* 59 (2008) 2-11.
- [4] A. Agarwal, S. Gupta and R.K. Sharma, Role of oxidative stress in female reproduction, *Reprod Biol Endocrinol* 3 (2005) 28.
- [5] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes and J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol Cell Biochem* 266 (2004) 37-56.
- [6] N. Botto, S. Masetti, L. Petrozzi, C. Vassalle, S. Manfredi, A. Biagini and M.G. Andreassi, Elevated levels of oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease, *Coron Artery Dis* 13 (2002) 269-274.
- [7] R.A. Floyd, Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders, *Proc Soc Exp Biol Med* 222 (1999) 236-245.
- [8] C.P. Chengelis, J.B. Kirkpatrick, K.S. Regan, A.E. Radovsky, M.J. Beck, O. Morita, Y. Tamaki and H. Suzuki, 28-Day oral (gavage) toxicity studies of green tea catechins prepared for beverages in rats, *Food Chem Toxicol* 46 (2008) 978-989.
- [9] T.P. Devasagayam, J.C. Tilak, K.K. Bloor, K.S. Sane, S.S. Ghaskadbi and R.D. Lele, Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects, *J Assoc Physicians India* 52 (2004) 794-804.
- [10] T.D. Northrop-Clewes CA, *Vitamins and the prevention of cancer*, in: *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*, R.C.a.R. B (Ed.), Woodhead Publishing, Cambridge, 2004, pp. 687-707.
- [11] F. Ferk, A. Chakraborty, M. Dusinska, M. Kundi, J. Bichler, M. Misik, K.H. Wagner, B. Grasl-Kraupp, T. Simic and S. Knasmüller, Gallic acid protects DNA-damage and irradiation-induced formation of preneoplastic liver foci: results of human and animal studies, *in preparation*.
- [12] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu and Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ Mol Mutagen* 35 (2000) 206-221.
- [13] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice and E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res* 175 (1988) 184-191.
- [14] R. Kohen and A. Nyska, Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, *Toxicol Pathol* 30 (2002) 620-650.
- [15] R. Blomhoff, Dietary antioxidants and cardiovascular disease, *Curr Opin Lipidol* 16 (2005) 47-54.

- [16] J.M. McCord, The evolution of free radicals and oxidative stress, *Am J Med* 108 (2000) 652-659.
- [17] R. Franco, O. Schoneveld, A.G. Georgakilas and M.I. Panayiotidis, Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis, *Cancer Lett* 266 (2008) 6-11.
- [18] O.I. Shadyro, I.L. Yurkova and M.A. Kisel, Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane, *Int J Radiat Biol* 78 (2002) 211-217.
- [19] H.S. Koren, Associations between criteria air pollutants and asthma, *Environ Health Perspect* 103 Suppl 6 (1995) 235-242.
- [20] K. Victorin, Review of the genotoxicity of nitrogen oxides, *Mutat Res* 317 (1994) 43-55.
- [21] A. Wiseman, T. Ridgway, P.S. Goldfarb and L. Woods, Are food and environmental toxicants 'overdetected' by bioassay?, *Trends Biotechnol* 20 (2002) 13-15.
- [22] D.V. Parke and A. Sapota, Chemical toxicity and reactive oxygen species, *Int J Occup Med Environ Health* 9 (1996) 331-340.
- [23] W.T. Ekert GP, Schaffer S, Theobald S, Müller WE, Oxidativer Stress- Apothekenrelevante Messmethoden, www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=1418, 7. Oktober, 2006.
- [24] B. Halliwell, Oxidative stress and cancer: have we moved forward?, *Biochem J* 401 (2007) 1-11.
- [25] J.E. Klaunig and L.M. Kamendulis, The role of oxidative stress in carcinogenesis, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44 (2004) 239-267.
- [26] S.P. Hussain, L.J. Hofseth and C.C. Harris, Radical causes of cancer, *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 276-285.
- [27] M.D. Evans, M. Dizdaroglu and M.S. Cooke, Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance, *Mutat Res* 567 (2004) 1-61.
- [28] L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis* 21 (2000) 361-370.
- [29] M. Moriya, Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 1122-1126.
- [30] T.M. Hagen, S. Huang, J. Curnutte, P. Fowler, V. Martinez, C.M. Wehr, B.N. Ames and F.V. Chisari, Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 12808-12812.
- [31] L. Rensing, Psychosozialer Streß und Herz-Kreislauf-Risiken: Neue Einsichten in komplexe Wirkungsmechanismen, *Blickpunt DER MANN* 5 (2007) 12-18.
- [32] B. Molavi and J.L. Mehta, Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations, *Curr Opin Cardiol* 19 (2004) 488-493.
- [33] H. Itabe, Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified, *Biol Pharm Bull* 26 (2003) 1-9.
- [34] V. Fuster, L. Badimon, J.J. Badimon and J.H. Chesebro, The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2), *N Engl J Med* 326 (1992) 310-318.
- [35] Z.Z. Chong, F. Li and K. Maiese, Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease, *Prog Neurobiol* 75 (2005) 207-246.

- [36] V. Calabrese, T.E. Bates and A.M. Stella, NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance, *Neurochem Res* 25 (2000) 1315-1341.
- [37] K. Cui, X. Luo, K. Xu and M.R. Ven Murthy, Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28 (2004) 771-799.
- [38] K.K. Chung, V.L. Dawson and T.M. Dawson, New insights into Parkinson's disease, *J Neurol* 250 Suppl 3 (2003) III15-24.
- [39] H. Bickel Das Wichtigste 1 - Die Epidemiologie der Demenz, Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V., 10969 Berlin, 2008.
- [40] D. Harman, Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J Gerontol* 11 (1956) 298-300.
- [41] R.S. Sohal and R. Weindruch, Oxidative stress, caloric restriction, and aging, *Science* 273 (1996) 59-63.
- [42] T. von Zglinicki, G. Saretzki, W. Docke and C. Lotze, Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?, *Exp Cell Res* 220 (1995) 186-193.
- [43] P. Jansen-Durr and H.D. Osiewacz, Healthy ageing: a question of stress, damage and repair. Meeting on mechanisms of biological ageing, *EMBO Rep* 3 (2002) 1127-1132.
- [44] R. Adelman, R.L. Saul and B.N. Ames, Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 2706-2708.
- [45] S. Loft, K. Vistisen, M. Ewertz, A. Tjonneland, K. Overvad and H.E. Poulsen, Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index, *Carcinogenesis* 13 (1992) 2241-2247.
- [46] M.K. Shigenaga, C.J. Gimeno and B.N. Ames, Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 9697-9701.
- [47] L. Packer and K. Fuehr, Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells, *Nature* 267 (1977) 423-425.
- [48] T. Finkel and N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature* 408 (2000) 239-247.
- [49] E.J. Masoro, Caloric restriction and aging: an update, *Exp Gerontol* 35 (2000) 299-305.
- [50] M. De la Fuente, A. Hernanz and M.C. Vallejo, The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise, *Antioxid Redox Signal* 7 (2005) 1356-1366.
- [51] A. Agarwal, S. Gupta and R. Sharma, Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective, *Reprod Biomed Online* 11 (2005) 641-650.
- [52] A. Spector, Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action, *Faseb J* 9 (1995) 1173-1182.
- [53] H. Sies and W. Stahl, Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants, *Am J Clin Nutr* 62 (1995) 1315S-1321S.

- [54] C.A. Rice-Evans and N.J. Miller, Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food, *Biochem Soc Trans* 24 (1996) 790-795.
- [55] C.L. Rock, R.A. Jacob and P.E. Bowen, Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids, *J Am Diet Assoc* 96 (1996) 693-702; quiz 703-694.
- [56] H. Kasai, Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, *Mutat Res* 387 (1997) 147-163.
- [57] A. Rietveld and S. Wiseman, Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials, *J Nutr* 133 (2003) 3285S-3292S.
- [58] M.D. Brown, Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer, *Altern Med Rev* 4 (1999) 360-370.
- [59] N. Ahmad and H. Mukhtar, Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanisms and practical implications, *Nutr Rev* 57 (1999) 78-83.
- [60] J.D. Lambert, S. Sang and C.S. Yang, Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites, *Mol Pharm* 4 (2007) 819-825.
- [61] D.A. Balentine, S.A. Wiseman and L.C. Bouwens, The chemistry of tea flavonoids, *Crit Rev Food Sci Nutr* 37 (1997) 693-704.
- [62] H.N. Graham, Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry, *Prev Med* 21 (1992) 334-350.
- [63] L. Chen, M.J. Lee, H. Li and C.S. Yang, Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats, *Drug Metab Dispos* 25 (1997) 1045-1050.
- [64] N.T. Zaveri, Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications, *Life Sci* 78 (2006) 2073-2080.
- [65] N. Salah, N.J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G.P. Bolwell and C. Rice-Evans, Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants, *Arch Biochem Biophys* 322 (1995) 339-346.
- [66] I.C. Arts, D.R. Jacobs, Jr., L.J. Harnack, M. Gross and A.R. Folsom, Dietary catechins in relation to coronary heart disease death among postmenopausal women, *Epidemiology* 12 (2001) 668-675.
- [67] L. Chen and H.Y. Zhang, Cancer preventive mechanisms of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate, *Molecules* 12 (2007) 946-957.
- [68] S.K. Mantena, A.M. Roy and S.K. Katiyar, Epigallocatechin-3-gallate inhibits photocarcinogenesis through inhibition of angiogenic factors and activation of CD8⁺ T cells in tumors, *Photochem Photobiol* 81 (2005) 1174-1179.
- [69] J. Mimoto, K. Kiura, K. Matsuo, T. Yoshino, I. Takata, H. Ueoka, M. Kataoka and M. Harada, (-)-Epigallocatechin gallate can prevent cisplatin-induced lung tumorigenesis in A/J mice, *Carcinogenesis* 21 (2000) 915-919.
- [70] I.C. Arts, D.R. Jacobs, Jr., M. Gross, L.J. Harnack and A.R. Folsom, Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study (United States), *Cancer Causes Control* 13 (2002) 373-382.
- [71] J.J. Chen, Z.Q. Ye and M.W. Koo, Growth inhibition and cell cycle arrest effects of epigallocatechin gallate in the NBT-II bladder tumour cell line, *BJU Int* 93 (2004) 1082-1086.

- [72] E.C. Stuart, M.J. Scandlyn and R.J. Rosengren, Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer, *Life Sci* 79 (2006) 2329-2336.
- [73] R.L. Thangapazham, A.K. Singh, A. Sharma, J. Warren, J.P. Gaddipati and R.K. Maheshwari, Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo, *Cancer Lett* 245 (2007) 232-241.
- [74] Y. Cao and R. Cao, Angiogenesis inhibited by drinking tea, *Nature* 398 (1999) 381.
- [75] U. Pfeffer, N. Ferrari, M. Morini, R. Benelli, D.M. Noonan and A. Albini, Antiangiogenic activity of chemopreventive drugs, *Int J Biol Markers* 18 (2003) 70-74.
- [76] C. Han, Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols, *Cancer Lett* 114 (1997) 153-158.
- [77] Z.Y. Wang, S.J. Cheng, Z.C. Zhou, M. Athar, W.A. Khan, D.R. Bickers and H. Mukhtar, Antimutagenic activity of green tea polyphenols, *Mutat Res* 223 (1989) 273-285.
- [78] D. Erba, P. Riso, A. Bordoni, P. Foti, P.L. Biagi and G. Testolin, Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans, *J Nutr Biochem* 16 (2005) 144-149.
- [79] J.L. Schwartz, V. Baker, E. Larios and F.L. Chung, Molecular and cellular effects of green tea on oral cells of smokers: a pilot study, *Mol Nutr Food Res* 49 (2005) 43-51.
- [80] H. Luo, L. Tang, M. Tang, M. Billam, T. Huang, J. Yu, Z. Wei, Y. Liang, K. Wang, Z.Q. Zhang, L. Zhang and J.S. Wang, Phase IIa chemoprevention trial of green tea polyphenols in high-risk individuals of liver cancer: modulation of urinary excretion of green tea polyphenols and 8-hydroxydeoxyguanosine, *Carcinogenesis* 27 (2006) 262-268.
- [81] M. Kanadzu, Y. Lu and K. Morimoto, Dual function of (–)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes, *Cancer Lett* 241 (2006) 250-255.
- [82] J.F. Young, L.O. Dragstedt, J. Haraldsdottir, B. Daneshvar, M.A. Kall, S. Loft, L. Nilsson, S.E. Nielsen, B. Mayer, L.H. Skibsted, T. Huynh-Ba, A. Hermetter and B. Sandstrom, Green tea extract only affects markers of oxidative status postprandially: lasting antioxidant effect of flavonoid-free diet, *Br J Nutr* 87 (2002) 343-355.
- [83] I.A. Hakim, R.B. Harris, S. Brown, H.H. Chow, S. Wiseman, S. Agarwal and W. Talbot, Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study, *J Nutr* 133 (2003) 3303S-3309S.
- [84] J.E. Klaunig, Y. Xu, C. Han, L.M. Kamendulis, J. Chen, C. Heiser, M.S. Gordon and E.R. Mohler, 3rd, The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers, *Proc Soc Exp Biol Med* 220 (1999) 249-254.
- [85] H. Liu, Z. Guo, L. Xu and S. Hsu, Protective effect of green tea polyphenols on tributyltin-induced oxidative damage detected by in vivo and in vitro models, *Environ Toxicol* 23 (2008) 77-83.
- [86] M. Inagake, T. Yamane, Y. Kitao, K. Oya, H. Matsumoto, N. Kikuoka, H. Nakatani, T. Takahashi, H. Nishimura and A. Iwashima, Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage by green tea extract in rat, *Jpn J Cancer Res* 86 (1995) 1106-1111.
- [87] Q. Meng, C.N. Velalar and R. Ruan, Regulating the age-related oxidative damage, mitochondrial integrity, and antioxidative enzyme activity in Fischer 344 rats by supplementation of the antioxidant epigallocatechin-3-gallate, *Rejuvenation Res* 11 (2008) 649-660.

- [88] R. Hasegawa, T. Chujo, K. Sai-Kato, T. Umemura, A. Tanimura and Y. Kurokawa, Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane, *Food Chem Toxicol* 33 (1995) 961-970.
- [89] K. Sai, S. Kai, T. Umemura, A. Tanimura, R. Hasegawa, T. Inoue and Y. Kurokawa, Protective effects of green tea on hepatotoxicity, oxidative DNA damage and cell proliferation in the rat liver induced by repeated oral administration of 2-nitropropane, *Food Chem Toxicol* 36 (1998) 1043-1051.
- [90] Y. Xu, C.T. Ho, S.G. Amin, C. Han and F.L. Chung, Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants, *Cancer Res* 52 (1992) 3875-3879.
- [91] S.H. Kim, C.D. Jun, K. Suk, B.J. Choi, H. Lim, S. Park, S.H. Lee, H.Y. Shin, D.K. Kim and T.Y. Shin, Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells, *Toxicol Sci* 91 (2006) 123-131.
- [92] N. Berardini, R. Carle and A. Schieber, Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. 'Tommy Atkins') peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom* 18 (2004) 2208-2216.
- [93] Y. Cai, M. Sun, J. Xing and H. Corke, Antioxidant phenolic constituents in roots of *Rheum officinale* and *Rubia cordifolia*: structure-radical scavenging activity relationships, *J Agric Food Chem* 52 (2004) 7884-7890.
- [94] M. Papagiannopoulos, H.R. Wollseifen, A. Mellenthin, B. Haber and R. Galensa, Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn, *J Agric Food Chem* 52 (2004) 3784-3791.
- [95] G.C. Yen, P.D. Duh and H.L. Tsai, Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid, *Food Chemistry* 79 (2002) 307-313.
- [96] S. Shahrzad, K. Aoyagi, A. Winter, A. Koyama and I. Bitsch, Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans, *J Nutr* 131 (2001) 1207-1210.
- [97] M. Beljanski and S. Crochet, Differential effects of ferritin, calcium, zinc, and gallic acid on in vitro proliferation of human glioblastoma cells and normal astrocytes, *J Lab Clin Med* 123 (1994) 547-555.
- [98] H.U. Gali, E.M. Perchellet, D.S. Klish, J.M. Johnson and J.P. Perchellet, Antitumor-promoting activities of hydrolyzable tannins in mouse skin, *Carcinogenesis* 13 (1992) 715-718.
- [99] H.U. Gali, E.M. Perchellet and J.P. Perchellet, Inhibition of tumor promoter-induced ornithine decarboxylase activity by tannic acid and other polyphenols in mouse epidermis in vivo, *Cancer Res* 51 (1991) 2820-2825.
- [100] M. Inoue, R. Suzuki, T. Koide, N. Sakaguchi, Y. Ogihara and Y. Yabu, Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells, *Biochem Biophys Res Commun* 204 (1994) 898-904.
- [101] M. Inoue, R. Suzuki, N. Sakaguchi, Z. Li, T. Takeda, Y. Ogihara, B.Y. Jiang and Y. Chen, Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid, *Biol Pharm Bull* 18 (1995) 1526-1530.
- [102] H.F. Stich and M.P. Rosin, Naturally occurring phenolics as antimutagenic and anticarcinogenic agents, *Adv Exp Med Biol* 177 (1984) 1-29.
- [103] B.H. Kroes, A.J. van den Berg, H.C. Quarles van Ufford, H. van Dijk and R.P. Labadie, Anti-inflammatory activity of gallic acid, *Planta Med* 58 (1992) 499-504.

- [104] M. Brune, L. Rossander and L. Hallberg, Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures, *Eur J Clin Nutr* 43 (1989) 547-557.
- [105] A. Carmona, Tannins: thermostable pigments which complex dietary proteins and inhibit digestive enzymes, *Arch Latinoam Nutr* 44 (1996) 31S-35S.
- [106] M. Zhu, J.D. Phillipson, P.M. Greengrass, N.E. Bowery and Y. Cai, Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein?, *Phytochemistry* 44 (1997) 441-447.
- [107] N.M. Gandhi and C.K. Nair, Protection of DNA and membrane from gamma radiation induced damage by gallic acid, *Mol Cell Biochem* 278 (2005) 111-117.
- [108] L.T. Wu, C.C. Chu, J.G. Chung, C.H. Chen, L.S. Hsu, J.K. Liu and S.C. Chen, Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes, *Mutat Res* 556 (2004) 75-82.
- [109] Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsorschung and Schweizerische Vereinigung für Ernährung, *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*, Umschau Braus GmbH, Frankfurt am Main, 2000.
- [110] B. Halliwell, Vitamin C and genomic stability, *Mutat Res* 475 (2001) 29-35.
- [111] I. Elmadfa and C. Leitmann, *Ernährung des Menschen*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1988.
- [112] T.L. Duarte and J. Lunec, Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C, *Free Radic Res* 39 (2005) 671-686.
- [113] R.C. Rose and A.M. Bode, Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate, *Faseb J* 7 (1993) 1135-1142.
- [114] J.M. May, Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?, *Faseb J* 13 (1999) 995-1006.
- [115] L.M. Antunes and C.S. Takahashi, Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures, *Teratog Carcinog Mutagen* 19 (1999) 53-59.
- [116] M.V. Clement, J. Ramalingam, L.H. Long and B. Halliwell, The in vitro cytotoxicity of ascorbate depends on the culture medium used to perform the assay and involves hydrogen peroxide, *Antioxid Redox Signal* 3 (2001) 157-163.
- [117] H. Nefic, The genotoxicity of vitamin C in vitro, *Bosn J Basic Med Sci* 8 (2008) 141-146.
- [118] R.J. Shamberger, Genetic toxicology of ascorbic acid, *Mutat Res* 133 (1984) 135-159.
- [119] K.E. Herbert, S. Fletcher, D. Chauhan, A. Ladapo, J. Nirwan, S. Munson and P. Mistry, Dietary supplementation with different vitamin C doses: no effect on oxidative DNA damage in healthy people, *Eur J Nutr* 45 (2006) 97-104.
- [120] M.H. Green, J.E. Lowe, A.P. Waugh, K.E. Aldridge, J. Cole and C.F. Arlett, Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells, *Mutat Res* 316 (1994) 91-102.
- [121] M. Panayiotidis and A.R. Collins, Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay, *Free Radic Res* 27 (1997) 533-537.
- [122] D. Anderson, B.J. Phillips, T.W. Yu, A.J. Edwards, R. Ayesh and K.R. Butterworth, The effects of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with "low" or "high" cholesterol levels, *Environ Mol Mutagen* 30 (1997) 161-174.

- [123] S.B. Astley, R.M. Elliott, D.B. Archer and S. Southon, Evidence that dietary supplementation with carotenoids and carotenoid-rich foods modulates the DNA damage: repair balance in human lymphocytes, *Br J Nutr* 91 (2004) 63-72.
- [124] S.W. Choi, I.F. Benzie, A.R. Collins, B.M. Hannigan and J.J. Strain, Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress, *Mutat Res* 551 (2004) 109-117.
- [125] R.W. Welch, E. Turley, S.F. Sweetman, G. Kennedy, A.R. Collins, A. Dunne, M.B. Livingstone, P.G. McKenna, V.J. McKelvey-Martin and J.J. Strain, Dietary antioxidant supplementation and DNA damage in smokers and nonsmokers, *Nutr Cancer* 34 (1999) 167-172.
- [126] B.M. Lee, S.K. Lee and H.S. Kim, Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, beta-carotene and red ginseng), *Cancer Lett* 132 (1998) 219-227.
- [127] M.S. Cooke, M.D. Evans, I.D. Podmore, K.E. Herbert, N. Mistry, P. Mistry, P.T. Hickenbotham, A. Hussien, H.R. Griffiths and J. Lunec, Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage, *FEBS Lett* 439 (1998) 363-367.
- [128] I.D. Podmore, H.R. Griffiths, K.E. Herbert, N. Mistry, P. Mistry and J. Lunec, Vitamin C exhibits pro-oxidant properties, *Nature* 392 (1998) 559.
- [129] M.D. Evans, M.S. Cooke, M. Akil, A. Samanta and J. Lunec, Aberrant processing of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus, *Biochem Biophys Res Commun* 273 (2000) 894-898.
- [130] A. Vojdani, M. Bazargan, E. Vojdani and J. Wright, New evidence for antioxidant properties of vitamin C, *Cancer Detect Prev* 24 (2000) 508-523.
- [131] H.Y. Huang, K.J. Helzlsouer and L.J. Appel, The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (2000) 647-652.
- [132] H. Prieme, S. Loft, K. Nyyssonen, J.T. Salonen and H.E. Poulsen, No effect of supplementation with vitamin E, ascorbic acid, or coenzyme Q10 on oxidative DNA damage estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion in smokers, *Am J Clin Nutr* 65 (1997) 503-507.
- [133] T.C. Wu, Y.C. Huang, S.Y. Hsu, Y.C. Wang and S.L. Yeh, Vitamin E and vitamin C supplementation in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Int J Vitam Nutr Res* 77 (2007) 272-279.
- [134] L.A. Brennan, G.M. Morris, G.R. Wasson, B.M. Hannigan and Y.A. Barnett, The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H₂O₂-induced DNA damage in human lymphocytes, *Br J Nutr* 84 (2000) 195-202.
- [135] D.C. Tarng, T.Y. Liu and T.P. Huang, Protective effect of vitamin C on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level in peripheral blood lymphocytes of chronic hemodialysis patients, *Kidney Int* 66 (2004) 820-831.
- [136] A.R. Proteggente, A. Rehman, B. Halliwell and C.A. Rice-Evans, Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect in vivo?, *Biochem Biophys Res Commun* 277 (2000) 535-540.
- [137] S.I. Franke, D. Pra, J. da Silva, B. Erdtmann and J.A. Henriques, Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo, *Mutat Res* 583 (2005) 75-84.

- [138] S. Cadenas, G. Barja, H.E. Poulsen and S. Loft, Oxidative DNA damage estimated by oxo8dG in the liver of guinea-pigs supplemented with graded dietary doses of ascorbic acid and alpha-tocopherol, *Carcinogenesis* 18 (1997) 2373-2377.
- [139] B.S. De Martinis and M.D. Bianchi, Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats, *Pharmacol Res* 44 (2001) 317-320.
- [140] E.O. Farombi, M. Hansen, G. Ravn-Haren, P. Moller and L.O. Dragsted, Commonly consumed and naturally occurring dietary substances affect biomarkers of oxidative stress and DNA damage in healthy rats, *Food Chem Toxicol* 42 (2004) 1315-1322.
- [141] O.I. Aruoma, Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods, *Mutat Res* 523-524 (2003) 9-20.
- [142] C. Hoelzl, J. Bichler, F. Ferik, T. Simic, A. Nersesyan, L. Elbling, V. Ehrlich, A. Chakraborty and S. Knasmuller, Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies, *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 2 (2005) 49-64.
- [143] B. Rydberg and K.J. Hohanson, *Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells*, in: *DNA Repair Mechanisms*, P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg and C.F. Fox (Eds.), New York, 1978, pp. 465-468.
- [144] O. Ostling and K.J. Johanson, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun* 123 (1984) 291-298.
- [145] P. Moller, Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96 Suppl 1 (2005) 1-42.
- [146] A.R. Collins, S.J. Duthie and V.L. Dobson, Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis* 14 (1993) 1733-1735.
- [147] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol Biotechnol* 26 (2004) 249-261.
- [148] B. Burlinson, R.R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S.Y. Brendler-Schwaab, A.R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T.S. Kumaravel, M. Nakajima, Y.F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez and A. Hartmann, Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup, *Mutat Res* 627 (2007) 31-35.
- [149] D.P. Lovell and T. Omori, Statistical issues in the use of the comet assay, *Mutagenesis* 23 (2008) 171-182.
- [150] C. Hoelzl, S. Knasmuller, M. Misik, A. Collins, M. Dusinska and A. Nersesyan, Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: Recent results and trends, *Mutat Res* (2008).
- [151] A. Collins, M. Dusinska, M. Franklin, M. Somorovska, H. Petrovska, S. Duthie, L. Fillion, M. Panayiotidis, K. Raslova and N. Vaughan, Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications, *Environ Mol Mutagen* 30 (1997) 139-146.
- [152] J. Bichler, C. Cavin, T. Simic, A. Chakraborty, F. Ferik, C. Hoelzl, R. Schulte-Hermann, M. Kundi, G. Haidinger, K. Angelis and S. Knasmuller, Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-P-2) induced DNA-damage: results of an experimental study with human volunteers, *Food Chem Toxicol* 45 (2007) 1428-1436.
- [153] H. Steinkellner, C. Hoelzl, M. Uhl, C. Cavin, G. Haidinger, A. Gsur, R. Schmid, M. Kundi, J. Bichler and S. Knasmuller, Coffee consumption induces GSTP in plasma and protects

- lymphocytes against (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induced DNA-damage: results of controlled human intervention trials, *Mutat Res* 591 (2005) 264-275.
- [154] P. Moller, U. Vogel, A. Pedersen, L.O. Dragsted, B. Sandstrom and S. Loft, No effect of 600 grams fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy nonsmokers, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12 (2003) 1016-1022.
 - [155] A. Ghiselli, M. Serafini, F. Natella and C. Scaccini, Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data, *Free Radic Biol Med* 29 (2000) 1106-1114.
 - [156] A. Somogyi, K. Rosta, P. Pusztai, Z. Tulassay and G. Nagy, Antioxidant measurements, *Physiol Meas* 28 (2007) R41-55.
 - [157] N.J. Miller, C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan and A. Milner, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin Sci (Lond)* 84 (1993) 407-412.
 - [158] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med* 26 (1999) 1231-1237.
 - [159] M.A. Fischer, T.J. Gransier, L.M. Beckers, O. Bekers, A. Bast and G.R. Haenen, Determination of the antioxidant capacity in blood, *Clin Chem Lab Med* 43 (2005) 735-740.
 - [160] G. Hofer, D. Lichtenberg, G.M. Kostner and A. Hermetter, Oxidation of fluorescent glycerol- and sphingophospholipids in human plasma lipoproteins: alkenylacyl subclasses are preferred targets, *Clin Biochem* 29 (1996) 445-450.
 - [161] J.L. Witztum and D. Steinberg, Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis, *J Clin Invest* 88 (1991) 1785-1792.
 - [162] A.C. Chan, Vitamin E and atherosclerosis, *J Nutr* 128 (1998) 1593-1596.
 - [163] P.M. Abuja and R. Albertini, Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Clin Chim Acta* 306 (2001) 1-17.
 - [164] A. Lapointe, C. Couillard and S. Lemieux, Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles, *J Nutr Biochem* 17 (2006) 645-658.
 - [165] G. Hofer, D. Lichtenberg and A. Hermetter, A new fluorescence method for the continuous determination of surface lipid oxidation in lipoproteins and plasma, *Free Radic Res* 23 (1995) 317-327.
 - [166] W.P. Cawthorn and J.K. Sethi, TNF-alpha and adipocyte biology, *FEBS Lett* 582 (2008) 117-131.
 - [167] R.A. Black, C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March and D.P. Cerretti, A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells, *Nature* 385 (1997) 729-733.
 - [168] M. Krieglner, C. Perez, K. DeFay, I. Albert and S.D. Lu, A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF, *Cell* 53 (1988) 45-53.
 - [169] L.A. Tartaglia and D.V. Goeddel, Two TNF receptors, *Immunol Today* 13 (1992) 151-153.
 - [170] R. van Horssen, T.L. Ten Hagen and A.M. Eggermont, TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility, *Oncologist* 11 (2006) 397-408.

- [171] K. Schroder, P.J. Hertzog, T. Ravasi and D.A. Hume, Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *J Leukoc Biol* 75 (2004) 163-189.
- [172] C. Carnaud, D. Lee, O. Donnars, S.H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka and A. Bendelac, Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells, *J Immunol* 163 (1999) 4647-4650.
- [173] L. Flaishon, R. Hershkovich, F. Lantner, O. Lider, R. Alon, Y. Levo, R.A. Flavell and I. Shachar, Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells, *J Exp Med* 192 (2000) 1381-1388.
- [174] D.M. Frucht, T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J.J. O'Shea and S. Koyasu, IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge, *Trends Immunol* 22 (2001) 556-560.
- [175] S. Gessani and F. Belardelli, IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance, *Cytokine Growth Factor Rev* 9 (1998) 117-123.
- [176] D.P. Harris, L. Haynes, P.C. Sayles, D.K. Duso, S.M. Eaton, N.M. Lepak, L.L. Johnson, S.L. Swain and F.E. Lund, Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells, *Nat Immunol* 1 (2000) 475-482.
- [177] T. Yoshimoto, K. Takeda, T. Tanaka, K. Ohkusu, S. Kashiwamura, H. Okamura, S. Akira and K. Nakanishi, IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production, *J Immunol* 161 (1998) 3400-3407.
- [178] G.C. Sen, Viruses and interferons, *Annu Rev Microbiol* 55 (2001) 255-281.
- [179] S. Akira, The role of IL-18 in innate immunity, *Curr Opin Immunol* 12 (2000) 59-63.
- [180] T. Fukao, S. Matsuda and S. Koyasu, Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells, *J Immunol* 164 (2000) 64-71.
- [181] M. Munder, M. Mallo, K. Eichmann and M. Modolell, Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation, *J Exp Med* 187 (1998) 2103-2108.
- [182] P. Kaiser, L. Rothwell, S. Avery and S. Balu, Evolution of the interleukins, *Dev Comp Immunol* 28 (2004) 375-394.
- [183] P. Choi and H. Reiser, IL-4: role in disease and regulation of production, *Clin Exp Immunol* 113 (1998) 317-319.
- [184] P.H. Hart, C.S. Bonder, J. Balogh, H.L. Dickensheets, R.P. Donnelly and J.J. Finlay-Jones, Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13, *J Leukoc Biol* 66 (1999) 575-578.
- [185] D.R. Hodge, E.M. Hurt and W.L. Farrar, The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer, *Eur J Cancer* 41 (2005) 2502-2512.
- [186] M. Song and J.A. Kellum, Interleukin-6, *Crit Care Med* 33 (2005) S463-465.
- [187] H. Lu, W. Ouyang and C. Huang, Inflammation, a key event in cancer development, *Mol Cancer Res* 4 (2006) 221-233.
- [188] A.D. Pradhan, J.E. Manson, N. Rifai, J.E. Buring and P.M. Ridker, C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus, *Jama* 286 (2001) 327-334.

- [189] P.M. Ridker, C.H. Hennekens, J.E. Buring and N. Rifai, C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women, *N Engl J Med* 342 (2000) 836-843.
- [190] P.M. Ridker, N. Rifai, M.J. Stampfer and C.H. Hennekens, Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men, *Circulation* 101 (2000) 1767-1772.
- [191] K.W. Moore, R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman and A. O'Garra, Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor, *Annu Rev Immunol* 19 (2001) 683-765.
- [192] K.N. Couper, D.G. Blount and E.M. Riley, IL-10: the master regulator of immunity to infection, *J Immunol* 180 (2008) 5771-5777.
- [193] N. Leitgeb, *Ionisierende Strahlung*, in: *Strahlen, Wellen, Felder- Ursachen und Auswirkungen auf Umwelt und Gesundheit*, G. Vollmer (Ed.), Deutscher Taschenbuch Verlag, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1990.
- [194] J. Kiefer, *Ionizing Radiation*, in: *Biological Radiation Effects*, J. Kiefer (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 1990.
- [195] U. Hagen, *Strahlungen*, in: *Lehrbuch der Toxikologie*, H. Marquardt and S. Schäfer (Eds.), Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 1994, pp. 630-649.
- [196] E.G. Wright and P.J. Coates, Untargeted effects of ionizing radiation: implications for radiation pathology, *Mutat Res* 597 (2006) 119-132.
- [197] D.R. Spitz, E.I. Azzam, J.J. Li and D. Gius, Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology, *Cancer Metastasis Rev* 23 (2004) 311-322.
- [198] S. Wada, H. Kurahayashi, Y. Kobayashi, T. Funayama, K. Yamamoto, M. Natsuhori and N. Ito, The relationship between cellular radiosensitivity and radiation-induced DNA damage measured by the comet assay, *J Vet Med Sci* 65 (2003) 471-477.
- [199] V. Benkovic, A.H. Knezevic, D. Dikic, D. Lisicic, N. Orsolic, I. Basic, I. Kosalec and N. Kopjar, Radioprotective effects of propolis and quercetin in gamma-irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay, *Phytomedicine* 15 (2008) 851-858.
- [200] D.K. Maurya, S. Adhikari, C.K. Nair and T.P. Devasagayam, DNA protective properties of vanillin against gamma-radiation under different conditions: possible mechanisms, *Mutat Res* 634 (2007) 69-80.
- [201] C.K. Nair and V.P. Salvi, Protection of DNA from gamma-radiation induced strand breaks by Epicatechin, *Mutat Res* 650 (2008) 48-54.
- [202] T. Sandhya, K.M. Lathika, B.N. Pandey, H.N. Bhilwade, R.C. Chaubey, K.I. Priyadarsini and K.P. Mishra, Protection against radiation oxidative damage in mice by Triphala, *Mutat Res* 609 (2006) 17-25.
- [203] C.A. van der Heijden, P.J. Janssen and J.J. Strik, Toxicology of gallates: a review and evaluation, *Food Chem Toxicol* 24 (1986) 1067-1070.
- [204] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud and R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop, *Mutagenesis* 18 (2003) 45-51.

- [205] Sigma-Aldrich, Accuspin System, <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/hematology-and-histology/accuspin-1077.html>, 16. Dezember, 2008
- [206] T. Lindl and J. Bauer, *Zell- und Gewebekultur*, Stuttgart, Jena, New York, 1994.
- [207] Y.F. Sasaki, S. Kawaguchi, A. Kamaya, M. Ohshita, K. Kabasawa, K. Iwama, K. Taniguchi and S. Tsuda, The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives, *Mutat Res* 519 (2002) 103-119.
- [208] Y. Dotan, D. Lichtenberg and I. Pinchuk, Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress, *Prog Lipid Res* 43 (2004) 200-227.
- [209] A. Bub, B. Watzl, M. Blockhaus, K. Briviba, U. Liegibel, H. Muller, B.L. Pool-Zobel and G. Rechkemmer, Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage, *J Nutr Biochem* 14 (2003) 90-98.
- [210] S. Salvini, F. Sera, D. Caruso, L. Giovannelli, F. Visioli, C. Saieva, G. Masala, M. Ceroti, V. Giovacchini, V. Pitozzi, C. Galli, A. Romani, N. Mulinacci, R. Bortolomeazzi, P. Dolara and D. Palli, Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women, *Br J Nutr* 95 (2006) 742-751.
- [211] A.M. Domijan, D. Zeljezic, M. Milic and M. Peraica, Fumonisin B(1): oxidative status and DNA damage in rats, *Toxicology* 232 (2007) 163-169.
- [212] P. Moller, Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA, *Mutat Res* 612 (2006) 84-104.
- [213] C.C. Smith, D.J. Adkins, E.A. Martin and M.R. O'Donovan, Recommendations for design of the rat comet assay, *Mutagenesis* 23 (2008) 233-240.
- [214] B.J. Majer, F. Kassie, Y. Sasaki, W. Pfau, H. Glatt, W. Meinl, F. Darroudi and S. Knasmuller, Investigation of the genotoxic effects of 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole in different organs of rodents and in human derived cells, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 802 (2004) 167-173.
- [215] R.E. Anderson and N.L. Warner, Ionizing radiation and the immune response, *Adv Immunol* 24 (1976) 215-335.
- [216] Clinical development plan: tea extracts. Green tea polyphenols. Epigallocatechin gallate, *J Cell Biochem Suppl* 26 (1996) 236-257.
- [217] B. Frei and J.V. Higdon, Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies, *J Nutr* 133 (2003) 3275S-3284S.
- [218] R.F. Anderson, L.J. Fisher, Y. Hara, T. Harris, W.B. Mak, L.D. Melton and J.E. Packer, Green tea catechins partially protect DNA from (.)OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals, *Carcinogenesis* 22 (2001) 1189-1193.
- [219] M. Glei and B.L. Pool-Zobel, The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes, *Toxicol In Vitro* 20 (2006) 295-300.
- [220] D. Sinha, S. Dey, R.K. Bhattacharya and M. Roy, In vitro mitigation of arsenic toxicity by tea polyphenols in human lymphocytes, *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 26 (2007) 207-220.
- [221] A. Sugisawa, M. Kimura, M. Fenech and K. Umegaki, Anti-genotoxic effects of tea catechins against reactive oxygen species in human lymphoblastoid cells, *Mutat Res* 559 (2004) 97-103.
- [222] J.H. Weisburger, Y. Hara, L. Dolan, F.Q. Luo, B. Pittman and E. Zang, Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens, *Mutat Res* 371 (1996) 57-63.

- [223] S. Azam, N. Hadi, N.U. Khan and S.M. Hadi, Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties, *Toxicol In Vitro* 18 (2004) 555-561.
- [224] C. Chen, G. Shen, V. Hebbar, R. Hu, E.D. Owuor and A.N. Kong, Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells, *Carcinogenesis* 24 (2003) 1369-1378.
- [225] A. Furukawa, S. Oikawa, M. Murata, Y. Hiraku and S. Kawanishi, (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA, *Biochem Pharmacol* 66 (2003) 1769-1778.
- [226] K. Saeki, N. Kobayashi, Y. Inazawa, H. Zhang, H. Nishitoh, H. Ichijo, K. Saeki, M. Isemura and A. Yuo, Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis, *Biochem J* 368 (2002) 705-720.
- [227] H. Sakagami, H. Arakawa, M. Maeda, K. Satoh, T. Kadofuku, K. Fukuchi and K. Gomi, Production of hydrogen peroxide and methionine sulfoxide by epigallocatechin gallate and antioxidants, *Anticancer Res* 21 (2001) 2633-2641.
- [228] N. Zhu, T.C. Huang, Y. Yu, E.J. LaVoie, C.S. Yang and C.T. Ho, Identification of oxidation products of (-)-epigallocatechin gallate and (-)-epigallocatechin with H₂O₂, *J Agric Food Chem* 48 (2000) 979-981.
- [229] L. Elbling, R.M. Weiss, O. Teufelhofer, M. Uhl, S. Knasmueller, R. Schulte-Hermann, W. Berger and M. Micksche, Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities, *Faseb J* 19 (2005) 807-809.
- [230] M.J. Lee, P. Maliakal, L. Chen, X. Meng, F.Y. Bondoc, S. Prabhu, G. Lambert, S. Mohr and C.S. Yang, Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 (2002) 1025-1032.
- [231] J.P. Spencer, H. Schroeter, A.J. Crossthwaite, G. Kuhnle, R.J. Williams and C. Rice-Evans, Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts, *Free Radic Biol Med* 31 (2001) 1139-1146.
- [232] C.I. Gill, S. Haldar, L.A. Boyd, R. Bennett, J. Whiteford, M. Butler, J.R. Pearson, I. Bradbury and I.R. Rowland, Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults, *Am J Clin Nutr* 85 (2007) 504-510.
- [233] M. Gleij, N. Habermann, K. Osswald, C. Seidel, C. Persin, G. Jahreis and B.L. Pool-Zobel, Assessment of DNA damage and its modulation by dietary and genetic factors in smokers using the Comet assay: a biomarker model, *Biomarkers* 10 (2005) 203-217.
- [234] A. Abdelwahed, I. Bouhlel, I. Skandrani, K. Valenti, M. Kadri, P. Guiraud, R. Steiman, A.M. Mariotte, K. Ghedira, F. Laporte, M.G. Dijoux-Franca and L. Chekir-Ghedira, Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus*. Confirmation by microarray expression profiling, *Chem Biol Interact* 165 (2007) 1-13.
- [235] A. Chakraborty, F. Ferk, T. Simic, A. Brantner, M. Dusinska, M. Kundi, C. Hoelzl, A. Nersesyan and S. Knasmueller, DNA-protective effects of sumach (*Rhus coriaria* L.), a common spice: Results of human and animal studies, *Mutat Res* 661 (2009) 10-17.

- [236] B. Frei and S. Lawson, Vitamin C and cancer revisited, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 11037-11038.
- [237] H. Sakagami, K. Satoh, K. Fukuchi, K. Gomi and M. Takeda, Effect on an iron-chelator on ascorbate-induced cytotoxicity, *Free Radic Biol Med* 23 (1997) 260-270.
- [238] H. Sakagami, K. Satoh, Y. Hakeda and M. Kumegawa, Apoptosis-inducing activity of vitamin C and vitamin K, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46 (2000) 129-143.
- [239] K. Satoh, Y. Ida, M. Hosaka, H. Arakawa, M. Maeda, M. Ishihara, S. Kunii, Y. Kanda, M. Toguchi and H. Sakagami, Induction of apoptosis by cooperative action of vitamins C and E, *Anticancer Res* 18 (1998) 4371-4375.
- [240] S.J. Padayatty, H. Sun, Y. Wang, H.D. Riordan, S.M. Hewitt, A. Katz, R.A. Wesley and M. Levine, Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use, *Ann Intern Med* 140 (2004) 533-537.
- [241] R.L. Prior, X. Wu and K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J Agric Food Chem* 53 (2005) 4290-4302.
- [242] C. Meisinger, J. Baumert, N. Khuseyinova, H. Loewel and W. Koenig, Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population, *Circulation* 112 (2005) 651-657.
- [243] S. Toshima, A. Hasegawa, M. Kurabayashi, H. Itabe, T. Takano, J. Sugano, K. Shimamura, J. Kimura, I. Michishita, T. Suzuki and R. Nagai, Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 (2000) 2243-2247.
- [244] B. Fuhrman and M. Aviram, Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol* 12 (2001) 41-48.
- [245] S.M. Henning, Y. Niu, Y. Liu, N.H. Lee, Y. Hara, G.D. Thames, R.R. Minutti, C.L. Carpenter, H. Wang and D. Heber, Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals, *J Nutr Biochem* 16 (2005) 610-616.
- [246] H. Sung, W.K. Min, W. Lee, S. Chun, H. Park, Y.W. Lee, S. Jang and D.H. Lee, The effects of green tea ingestion over four weeks on atherosclerotic markers, *Ann Clin Biochem* 42 (2005) 292-297.
- [247] H. Sung, J. Nah, S. Chun, H. Park, S.E. Yang and W.K. Min, In vivo antioxidant effect of green tea, *Eur J Clin Nutr* 54 (2000) 527-529.
- [248] M. Bertipaglia de Santana, M.G. Mandarino, J.R. Cardoso, I. Dichi, J.B. Dichi, A.E. Camargo, B.A. Fabris, R.J. Rodrigues, E.C. Fatel, S.L. Nixdorf, A.N. Simao, R. Cecchini and D.S. Barbosa, Association between soy and green tea (*Camellia sinensis*) diminishes hypercholesterolemia and increases total plasma antioxidant potential in dyslipidemic subjects, *Nutrition* 24 (2008) 562-568.
- [249] V.S. Panza, E. Wazlawik, G. Ricardo Schutz, L. Comin, K.C. Hecht and E.L. da Silva, Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men, *Nutrition* 24 (2008) 433-442.
- [250] K.H. van het Hof, H.S. de Boer, S.A. Wiseman, N. Lien, J.A. Weststrate and L.B. Tijburg, Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans, *Am J Clin Nutr* 66 (1997) 1125-1132.

- [251] K. Jacob, M.J. Periago, V. Bohm and G.R. Berrueto, Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation, *Br J Nutr* 99 (2008) 137-146.
- [252] T. Ashton, I.S. Young, J.R. Peters, E. Jones, S.K. Jackson, B. Davies and C.C. Rowlands, Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study, *J Appl Physiol* 87 (1999) 2032-2036.
- [253] C.T. Yeh, L.C. Ching and G.C. Yen, Inducing gene expression of cardiac antioxidant enzymes by dietary phenolic acids in rats, *J Nutr Biochem* 20 (2009) 163-171.
- [254] H.M. Princen, W. van Duyvenvoorde, R. Buytenhek, C. Blonk, L.B. Tijburg, J.A. Langius, A.E. Meinders and H. Pijl, No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid and antioxidant levels and on LDL oxidation in smokers, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (1998) 833-841.
- [255] J.M. Hodgson, I.B. Puddey, K.D. Croft, V. Burke, T.A. Mori, R.A. Caccetta and L.J. Beilin, Acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation, *Am J Clin Nutr* 71 (2000) 1103-1107.
- [256] R. Ohmori, T. Iwamoto, M. Tago, T. Takeo, T. Unno, H. Itakura and K. Kondo, Antioxidant activity of various teas against free radicals and LDL oxidation, *Lipids* 40 (2005) 849-853.
- [257] W. Lee, W.K. Min, S. Chun, Y.W. Lee, H. Park, D.H. Lee, Y.K. Lee and J.E. Son, Long-term effects of green tea ingestion on atherosclerotic biological markers in smokers, *Clin Biochem* 38 (2005) 84-87.
- [258] S. Inami, M. Takano, M. Yamamoto, D. Murakami, K. Tajika, K. Yodogawa, S. Yokoyama, N. Ohno, T. Ohba, J. Sano, C. Ibuki, Y. Seino and K. Mizuno, Tea catechin consumption reduces circulating oxidized low-density lipoprotein, *Int Heart J* 48 (2007) 725-732.
- [259] Y. Miura, T. Chiba, S. Miura, I. Tomita, K. Umegaki, M. Ikeda and T. Tomita, Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: an ex vivo study in humans, *J Nutr Biochem* 11 (2000) 216-222.
- [260] K. Nyyssonen, H.E. Poulsen, M. Hayn, P. Agerbo, E. Porkkala-Sarataho, J. Kaikkonen, R. Salonen and J.T. Salonen, Effect of supplementation of smoking men with plain or slow release ascorbic acid on lipoprotein oxidation, *Eur J Clin Nutr* 51 (1997) 154-163.
- [261] S. Samman, A.J. Brown, C. Beltran and S. Singh, The effect of ascorbic acid on plasma lipids and oxidisability of LDL in male smokers, *Eur J Clin Nutr* 51 (1997) 472-477.
- [262] Y. Wen, T. Cooke and J. Feely, The effect of pharmacological supplementation with vitamin C on low-density lipoprotein oxidation, *Br J Clin Pharmacol* 44 (1997) 94-97.
- [263] J.E. Upritchard, W.H. Sutherland and J.I. Mann, Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes, *Diabetes Care* 23 (2000) 733-738.
- [264] Q. Lu, I. Bjorkhem, B. Wretling, U. Diczfalusy, P. Henriksson and A. Freyschuss, Effect of ascorbic acid on microcirculation in patients with Type II diabetes: a randomized placebo-controlled cross-over study, *Clin Sci (Lond)* 108 (2005) 507-513.
- [265] D. Harats, S. Chevion, M. Nahir, Y. Norman, O. Sagee and E.M. Berry, Citrus fruit supplementation reduces lipoprotein oxidation in young men ingesting a diet high in saturated fat: presumptive evidence for an interaction between vitamins C and E in vivo, *Am J Clin Nutr* 67 (1998) 240-245.

- [266] C.J. Fuller, S.M. Grundy, E.P. Norkus and I. Jialal, Effect of ascorbate supplementation on low density lipoprotein oxidation in smokers, *Atherosclerosis* 119 (1996) 139-150.
- [267] C. Antoniadou, D. Tousoulis, C. Tountas, C. Tentolouris, M. Toutouza, C. Vasiliadou, C. Tsioufis, P. Toutouzas and C. Stefanadis, Vascular endothelium and inflammatory process, in patients with combined Type 2 diabetes mellitus and coronary atherosclerosis: the effects of vitamin C, *Diabet Med* 21 (2004) 552-558.
- [268] M.P. de Maat, H. Pijl, C. Kluft and H.M. Princen, Consumption of black and green tea had no effect on inflammation, haemostasis and endothelial markers in smoking healthy individuals, *Eur J Clin Nutr* 54 (2000) 757-763.
- [269] Y. Wang, Y. Mei, D. Feng and L. Xu, (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects mice from concanavalin A-induced hepatitis through suppressing immune-mediated liver injury, *Clin Exp Immunol* 145 (2006) 485-492.
- [270] P.A. Abboud, P.W. Hake, T.J. Burroughs, K. Odoms, M. O'Connor, P. Mangeshkar, H.R. Wong and B. Zingarelli, Therapeutic effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of colitis, *Eur J Pharmacol* 579 (2008) 411-417.
- [271] P. He, Y. Noda and K. Sugiyama, Green tea suppresses lipopolysaccharide-induced liver injury in d-galactosamine-sensitized rats, *J Nutr* 131 (2001) 1560-1567.
- [272] M. Hisano, K. Yamaguchi, Y. Inoue, Y. Ikeda, M. Iijima, M. Adachi and T. Shimamura, Inhibitory effect of catechin against the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB), *Arch Dermatol Res* 295 (2003) 183-189.
- [273] D.C. Nieman, D.A. Henson, S.R. McAnulty, L. McAnulty, N.S. Swick, A.C. Utter, D.M. Vinci, S.J. Opiela and J.D. Morrow, Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon, *J Appl Physiol* 92 (2002) 1970-1977.
- [274] D.C. Nieman, E.M. Peters, D.A. Henson, E.I. Nevines and M.M. Thompson, Influence of vitamin C supplementation on cytokine changes following an ultramarathon, *J Interferon Cytokine Res* 20 (2000) 1029-1035.
- [275] R. Albers, M. Bol, R. Bleumink, A.A. Willems and R.H. Pieters, Effects of supplementation with vitamins A, C, and E, selenium, and zinc on immune function in a murine sensitization model, *Nutrition* 19 (2003) 940-946.
- [276] H. Fujiki, M. Suganuma, K. Imai and K. Nakachi, Green tea: cancer preventive beverage and/or drug, *Cancer Lett* 188 (2002) 9-13.
- [277] J.H. Weisburger and F.L. Chung, Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols, *Food Chem Toxicol* 40 (2002) 1145-1154.
- [278] I.M. Heinonen, P.J. Lehtonen and A.I. Hopia, Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liquors, *J Agric Food Chem* 46 (1998) 25-31.
- [279] J.C. Barreto, M.T. Trevisan, W.E. Hull, G. Erben, E.S. de Brito, B. Pfundstein, G. Wurtele, B. Spiegelhalder and R.W. Owen, Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.), *J Agric Food Chem* 56 (2008) 5599-5610.
- [280] M. Lopez-Velez, F. Martinez-Martinez and C. Del Valle-Ribes, The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine, *Crit Rev Food Sci Nutr* 43 (2003) 233-244.
- [281] A.N. Booth, M.S. Masri, D.J. Robbins, O.H. Emerson, F.T. Jones and F. De Eds, The metabolic fate of gallic acid and related compounds, *J Biol Chem* 234 (1959) 3014-3016.

- [282] N. Niho, M. Shibutani, T. Tamura, K. Toyoda, C. Uneyama, N. Takahashi and M. Hirose, Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats, *Food Chem Toxicol* 39 (2001) 1063-1070.
- [283] B. Halliwell, Vitamin C: poison, prophylactic or panacea?, *Trends Biochem Sci* 24 (1999) 255-259.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: Nina Kager
Geburtsdatum: 26. 12. 1982
Familienstand: ledig
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

Seit März 2007 Doktorat der Naturwissenschaften /Dissertationsgebiet Ernährungswissenschaften
Fakultät für Lebenswissenschaften, Universität Wien

Universitätslehrgang Toxikologie für Postgraduierte
Institut für Krebsforschung, Medizinische Universität Wien

Oktober 2001 – März 2007

Diplomstudium der Ernährungswissenschaften
Wahlschwerpunkt Ernährungsökonomie
Fakultät für Lebenswissenschaften, Universität Wien
Mag.rer.nat.

Berufliche Tätigkeiten

Seit Februar 2007

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Krebsforschung
Forschungseinheit Toxikologie und Prävention

Jänner 2007, 2008 und 2009

Tutorin am Institut für Medizinische Chemie, Medizinische Universität Wien,
Betreuung der biochemischen Übungen für Mediziner

Oktober bis Dezember 2006

Laborfachkraft bei Scheidl Umweltanalytik Ges.m.b.H

Mai 2006

Tutorin am Institut für Medizinische Chemie, Medizinische Universität Wien,
Betreuung der biochemischen Übungen für Ernährungswissenschaftler

August 2005 bis Dezember 2006

Assistentin der Geschäftsleitung, Firma Klaus Göttfert

Juli 2003 bis August 2005

Laborfachkraft und Sekretariat der Firma SYMRISE

Publikationsliste

N. Kager, F. Ferk, KH. Wagner und S. Knasmüller, Vergleichende Untersuchungen DNA-protectiver Effekte ausgewählter Antioxidantien (Gallussäure, Grüntee-Extrakt und Vitamin C) in inneren Organen und Blutzellen von Labornagern (2009). 24. GUM Tagung, Lifestyle und DNA-Stabilität, Wien, Österreich, Februar 2009, Seite 41.

W. Parzefall, N. Kager, and S. Knasmüller, Induction of DNA damage and cancer by dietary factors. In: *Chemoprevention of cancer and DNA damage by dietary factors*. (2009) Editors: Knasmüller S, DeMarini D, Johnson I, and Gerhäuser C. Wiley International, *In press*.

C. Hoelzl, C. Cavin, M. Kundi, KH. Wagner, O. Neubauer, T. Simic, L. Elbling, W. Huber, N. Kager, F. Ferk, V. Ehrlich, A. Nersesyan and S. Knasmüller. Influence of consumption of instant coffee on DNA migration and on biochemical antioxidant parameters: results of a clinical trial, *In preparation*.

S. Knasmüller, KH. Wagner, G. Haidinger, N. Kager, C. Hoelzl, F. Ferk, M. Misik, B. Moser, V. Ehrlich, M. Kundi, A. Nersesyan, Einsatz von Einzelzellgelelektrophoresetests in Human- und Tierstudien zur Erfassung DNA-protectiver Effekte von Nahrungsinhaltsstoffen (2009), 24. GUM Tagung, Lifestyle und DNA-Stabilität, Wien, Österreich, Februar 2009, Seite 44.

S. Knasmüller, M. Kundi, F. Ferk, B. Moser, N. Kager, C. Hoelzl, F. Ehrlich, M. Misik, KH. Wagner, C. Gerner, and A. Nersesyan, Human Biomonitoring (2008), *Symposium on Chemical Safety*, 26. September 2008.